

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 mars 2007 (15.03.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/028921 A2

- (51) Classification internationale des brevets : **Non classée**
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/050838
- (22) Date de dépôt international :
4 septembre 2006 (04.09.2006)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0509060 5 septembre 2005 (05.09.2005) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **CIS BIO INTERNATIONAL** [FR/FR]; Route Nationale 306, F-91400 Saclay (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PRI-BILLA, Iris** [DE/DE]; Limastrasse 9, 14163 Berlin (DE). **BAZIN, Hervé** [FR/FR]; 14 Allée de la Chenaie, F-30400 Villeneuve Les Avignon (FR). **GHOSE, Sraboni** [IN/FR]; 4 rue de Surville, F-30200 Chusclan (FR). **TINEL, Norbert** [FR/FR]; 120 Chemin des Terres Primes, F-34400 Lunel Viel (FR). **FINK, Michel** [FR/FR]; 9 avenue Bel-Horizon, F-30200 Bagnols Sur Ceze (FR). **TRINQUET, Eric** [FR/FR]; Chemin Notre Dame des Roses, F-30130 Pont Saint Esprit (FR). **MATHIS, Gérard** [FR/FR]; 17 Impasse Capelle des Ladres, F-30200 Bagnols Sur Ceze (FR).
- (74) Mandataires : **GILLARD, Marie-Louise** etc.; c/o Cabinet Beau De Loménie, 158 Rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING INTRACELLULAR INTERACTION BETWEEN BIOMOLECULES

(54) Titre : METHODE DE DETECTION D'INTERACTION INTRACELLULAIRE ENTRE BIO-MOLECULES

(57) Abstract: The invention concerns a quantitative non-microscopic method for detecting intracellular interaction between biomolecules, on living cells, in response to a biological or pharmacological stimulation, by time-resolved proximate energy transfer effect between a fluorescence donor/acceptor pair. The invention is useful for high throughput screening of molecules and intracellular signalling pathway detection.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode non microscopique, quantitative, de détection d'interactions intracellulaires entre bio-molécules, sur cellules vivantes, en réponse à une stimulation biologique ou pharmacologique, par effet de transfert d'énergie de proximité en temps résolu entre deux membres d'un couple donneur/accepteur de fluorescence. Applications : criblage à haut débit de molécules et détection des voies de signalisation intracellulaire

WO 2007/028921 A2

Méthode de détection d'interaction intracellulaire entre bio-molécules

La présente invention concerne une méthode non microscopique, quantitative, de détection d'interactions intracellulaires entre bio-molécules, sur cellules vivantes, en réponse à une stimulation biologique ou pharmacologique, par effet de transfert d'énergie de proximité en temps résolu entre deux membres d'un couple donneur/accepteur de fluorescence et ses applications telles que notamment le criblage à haut débit de molécules et la détection des voies de signalisation intracellulaire.

Domaine technique et art antérieur

Les molécules à activité pharmacologique (médicaments par exemple) agissent sur des cibles moléculaires localisées soit à la membrane plasmique soit à l'intérieur même des cellules vivantes. La sélection et l'optimisation de molécules candidates dans les processus de recherche au sein des industries pharmaceutiques nécessite de déterminer leurs actions moléculaires et, dans la mesure du possible, dans un environnement natif afin d'intégrer les modulations éventuellement apportées par des interactions entre différents partenaires. D'un point de vue plus fondamental, dans les conditions physiologiques ou pathologiques, il est important de disposer de modèles cellulaires où les interactions directes entre bio-molécules impliquées dans des voies de signalisation intracellulaire, peuvent être facilement étudiées, caractérisées et quantifiées [voir par exemple Takesono et al. *Journal of Cell Sciences*, 115, 3039-3048, (2002)]. Cette volonté de compréhension de mécanismes d'action en condition native explique pourquoi de plus en plus d'essais sur cellules sont utilisés dans les criblages primaires de molécules. Mais à l'heure actuelle, les techniques de criblage à haut débit permettent de détecter principalement les produits finaux des événements biologiques, tels que la production de seconds messagers. Dans ce cas, les cellules doivent être lysées pour permettre l'accès à la molécule cible intracellulaire qu'il faut doser. Très peu d'observations cinétiques sont actuellement possibles et les événements rares sont facilement non détectés. De nouvelles approches utilisant les techniques de *microscopie ou d'imagerie sur cellules vivantes* permettent d'avoir accès aux paramètres dynamiques et cinétiques d'une ou plusieurs bio-molécules d'intérêt dans leur environnement natif, en réponse à une stimulation. Ces techniques sont basées sur les études de mouvements de ces bio-molécules en réponse à un stimulus.

L'analyse de ces déplacements fait appel à un traitement des images qui donnent accès, a posteriori et par des méthodes indirectes, à des valeurs arbitraires qui permettent de quantifier les évènements biologiques considérés.

Ces techniques de microscopie consistent à déterminer la localisation d'une cible moléculaire et le suivi d'éventuels changements de localisation. Pour ces approches, la cible moléculaire est généralement fusionnée à une protéine fluorescente pouvant être de la famille des GFP. De telles techniques de visualisation directe à l'intérieur d'une cellule sont réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence classique, de microscopes cofocaux ou de nouvelles plates-formes intégrant la microscopie et l'acquisition d'image. De telles plates-formes sont, par exemple, utilisées dans la technologie TRANSFLUOR (Molecular Devices) ou sur des instruments tels que OPERA (Evotech Technologies) ou In Cell analyser (GE Healthcare) (voir revue de John Comley, DDW, summer 2005, pp 31-53).

De nombreux désavantages limitent toutefois l'utilisation de telles technologies :

- Les études microscopiques sont délicates, difficilement automatisables et elles nécessitent des outils complexes d'analyse d'image, des logiciels spécifiques et des utilisateurs très expérimentés et elles nécessitent beaucoup de temps.

- L'analyse des images est compliquée, souvent source d'erreurs et ces technologies sont difficilement reproductibles et peu fiables (faible valeur de paramètre Z').

- Elles permettent le suivi d'évènements biologiques dans des cellules vivantes avec un débit moyen de criblage de molécules limitant leur utilisation dans les étapes de criblage primaire.

- Les effets visualisés sont généralement en aval de la cascade de signalisation.

C'est pour ces principales raisons que ces techniques ne sont pas compatibles avec un criblage de molécules à haut débit.

Outre ces aspects, ces technologies servent à qualifier un ou plusieurs évènements cellulaires, qui découlent le plus souvent d'une cascade d'évènements antérieurs, ce qui donne un accès indirect à l'évènement que l'on souhaite mesurer. De plus, ces techniques ne permettent pas de donner directement des informations sur les interactions entre bio-molécules ou sur les changements de conformation au sein d'une même molécule qui sont tous deux des indicateurs directs de l'évènement biologique que l'on souhaite détecter et quantifier.

Actuellement les technologies intracellulaires permettant de caractériser les interactions entre bio-molécules ou les changements de conformation au sein d'une même bio-molécule, tous deux témoins d'événements biologiques, sont basées sur la technologie de transfert d'énergie (FRET) entre différentes protéines fluorescentes telles que la protéine fluorescente verte (GFP) et ses différents mutants. A titre d'exemple, deux variants protéiques de la GFP (CFP et YFP) forment une paire compatible pour établir un FRET. Elles peuvent être fusionnées avec les protéines cibles d'intérêt et être exprimées dans les cellules vivantes. De nombreux événements d'interaction ou de changements de conformation entre protéines ainsi marquées ont été détectés en utilisant un procédé de FRET (voir Janetopoulos et al. SCIENCE (2001) 291 : 2408-2411, Vilardaga et al. NATURE BIOTECH. (2003) 21 : 807-812 et WO 2004 057333 A1).

Les deux variants de la GFP (CFP et YFP) peuvent être également exprimés dans les cellules vivantes en fusion avec une seule et même protéine cible. Cette bio-molécule, doublement fusionnée avec les deux variants de la GFP, est définie comme bio-senseur. Un bio-senseur est capable d'adopter différentes conformations en fonction des changements d'environnement biologique, ces changements de conformation pouvant être suivis par un procédé de FRET. De telles bio-molécules peuvent être utilisées dans le suivi de nombreux événements cellulaires comme la production de cAMP, d'IP3 ou cGMP (voir Nikolaev et al., JBC, vol. 279, N°36, pp. 37215-37218, 2004, Tanimura et al. JBC, vol. 279, N°37, pp. 38095-38098, 2004 et le brevet US 6.924.119 B2).

Toutefois, l'utilisation de ces protéines fluorescentes présente certains désavantages majeurs:

- Les spectres de recouvrement des deux molécules fluorescentes (CFP et YFP) sont larges et ils entraînent une forte excitation parasite de l'accepteur (YFP) dans les longueurs d'ondes utilisées pour exciter le donneur (CFP). Cette contamination parasite induit un fort bruit de fond qui réduit le rapport signal sur bruit à une valeur inférieure à 1.5. De si faibles différences de modulation empêchent une utilisation confortable de ces techniques en criblage de molécule à haut débit.

- Aux longueurs d'ondes utilisées pour la détection du FRET avec ces protéines fluorescentes, une auto-fluorescence intrinsèque aux cellules perturbe la lecture de FRET.

- Des analyses microscopiques peuvent être nécessaires pour révéler des changements subtils en signaux de FRET. De telles analyses présentent alors les mêmes inconvénients que ceux décrits ci-dessus pour la première approche de détection.

- La limitation du nombre de variants de la GFP restreint l'utilisation de telles protéines à des applications où les changements de proximité sont en accord avec le rayon de Förster (R_0) de la paire CFP/YFP.

- Ces protéines sont fusionnées avec les protéines cibles. La fluorescence de ces protéines est détectée dès que la cellule l'exprime et ne peut être déclenchée ou contrôlée par l'expérimentateur sans mettre en place des systèmes d'expression beaucoup plus complexes.

Une alternative au FRET utilisant la GFP ou ses variants, qui peut être contrôlée par l'expérimentateur, est l'utilisation d'une molécule qui génère de la bioluminescence, on parle alors de BRET. Un processus de BRET peut avoir lieu, dans des cellules vivantes, entre des protéines marquées respectivement à la luciférase et à la GFP. Plusieurs interactions protéiques intracellulaires ont pu être mesurées en fusionnant la luciférase à l'un des partenaires et la GFP à l'autre (voir Milligan G Eur J Pharm Sci. 2004 Mar;21(4):397-405, Boute N et al. Trends Pharmacol Sci. 2002 Aug; 23(8):351-4 et Trugnan G. et al. Med Sci (Paris). 2004 Nov;20(11):1027-34.). Le processus de transfert d'énergie est initié lorsque le substrat de l'enzyme luciférase est apportée dans la préparation cellulaire à tester. La luciférase produit une lumière qui, dans le cas d'une interaction protéique permettant une proche proximité entre les deux partenaires, excite la GFP. Le signal de fluorescence émis par la GFP est alors mesuré.

Tout comme pour le couple CFP-YFP, de nombreux désavantages limitent l'utilisation du couple Luciférase-GFP en criblage au haut débit (HTS) :

- Le rapport signal/bruit des essais BRET est assez faible.
- Le signal de fluorescence peut être facilement masqué par une autofluorescence des produits testés. La technologie BRET n'est pas assez robuste pour un criblage de molécules du fait de la faible stabilité du signal dans le temps qui laisse une fenêtre de lecture très courte, peu compatible avec le criblage à haut débit de molécules.

Une autre série de technologies permettant d'étudier les interactions entre biomolécules consiste à utiliser un processus de complémentation fonctionnelle. Les bio-

molécules d'intérêt sont fusionnées avec 2 fragments inactifs d'une 3^{ème} protéine. Lorsque l'interaction directe entre les bio-molécules d'intérêt intervient, les 2 fragments inactifs de la 3^{ème} protéine reconstituent alors, par interaction directe ou par un processus plus complexe d'épissage protéique, une 3^{ème} protéine fonctionnelle dont l'activité peut être mesurée. Cette protéine, dont l'activité a été restaurée par l'interaction entre les bio-molécules d'intérêt, peut être une luciférase ; on mesure dans ce cas un signal de luminescence, une protéine fluorescente telle que la GFP (voir Ozawa T, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, N°5, pp578-583 pour revue) ou une enzyme telle que la β -galactosidase dont on mesure l'activité enzymatique par méthode colorimétrique (voir Eglen R, *ASSAY and Drug Develop. Technologies*, 2002, vol. 1, pp 97-104) et la méthode Path Hunter[®] de DISCOVER.

L'inconvénient principal de ces approches utilisant la complémentation fonctionnelle réside dans le fait que la mesure d'interaction entre bio-molécules est dépendante d'une parfaite reconstitution de la 3^{ème} protéine sous sa forme active, telle que la β -galactosidase et nécessite parfois un déplacement du complexe d'interaction dans un compartiment cellulaire autre que celui où interagissent normalement les bio-molécules. Enfin, il s'agit d'une méthode indirecte de caractérisation d'une interaction entre bio-molécules d'intérêt où la mesure d'une activité enzymatique rend compte de l'interaction. L'utilisation de la complémentation fonctionnelle est plus complexe à mettre en œuvre dans le cas d'une bio-molécule unique du type bio-senseur.

En fonction des propriétés intrinsèques des protéines mises œuvre dans ces processus de transfert d'énergie, les technologies utilisant des protéines fluorescentes telles que la GFP (ou ses autres variants) ou des protéines bio-luminescentes telle que la luciférase, ne permettent pas d'avoir une grande flexibilité dans le choix du couple donneur/accepteur impliqué dans le processus de transfert d'énergie.

L'utilisation de molécules fluorescentes particulières, appelées "QuantumDots", offre un nombre de couples donneur/accepteur possible beaucoup plus large, permet de travailler sur une gamme de longueur d'ondes d'excitation plus importante et permet, en combinant différents couples, de mesurer de façon concomitante différentes interactions entre bio-molécules (approche multiplex). Cependant, il est difficile de marquer spécifiquement les bio-molécules par ces composés dans la cellule.

L'utilisation de molécules organiques fluorescentes pour des applications en FRET intracellulaire a par exemple été décrite pour visualiser des ARN messagers dans les

cellules vivantes. L'interaction mise en œuvre dans ce cas repose sur un appariement entre l'ARN messager cible et des séquences d'oligonucléotides anti-sens marqués avec des molécules organiques fluorescentes (voir Dirks et al. 2003, METHODS, Jan 29, N°1, pp 51-57 et Tsuji et al. Biophys J. 2001 Jul; 81(1):501-15). L'information obtenue dans ce cas n'est pas quantitative puisqu'elle fait appel à une détection en microscopie. Par ailleurs, elle ne qualifie en rien une interaction entre deux bio-molécules d'intérêt et sert uniquement à révéler la présence d'un ARN messager d'intérêt.

Il existe dans la communauté scientifique un réel besoin de nouveaux outils et procédés permettant d'étudier les phénomènes biologiques dans des cellules vivantes, tout en s'affranchissant des inconvénients liés à l'utilisation des techniques connues.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente méthode d'analyse quantitative et directe d'interactions intracellulaires sur cellules vivantes sans l'aide de la microscopie, exploite les propriétés des composés fluorescents à durée de vie longue pour effectuer une détection par FRET en temps résolu (TR-FRET).

Cette technique met en œuvre un premier composé fluorescent donneur à durée de vie longue et un ou plusieurs composés fluorescents accepteurs possédant des caractéristiques spectrales compatibles avec le premier composé fluorescent.

Cette mesure de FRET en temps résolu permet de s'affranchir des problèmes de bruit de fond, d'auto-fluorescence des cellules et éventuellement des molécules à tester par deux voies :

- la longue durée de vie du composé fluorescent, de préférence supérieure à 100 nanosecondes, permet de définir une fenêtre de temps pour réaliser la mesure où les émissions des composés fluorescents à durée de vie courte ne sont pas présentes ;
- la mesure de deux traceurs, dont un comme référence, permet de compenser les effets d'auto-fluorescence résiduelle en utilisant comme lecture le rapport d'émission de fluorescence entre les deux traceurs.

De part sa sensibilité, sa spécificité, sa robustesse et sa résolution moléculaire, le TR-FRET permet dans la méthode de l'invention d'éliminer tous les désavantages des applications FRET entre CFP/YFP ou BRET avec la luciférase et la GFP observés dans les cellules vivantes, notamment :

- le large choix des composés fluorescents et la lecture en temps résolu permet

d'éliminer la forte excitation parasite de l'accepteur dans les longueurs d'ondes utilisées pour exciter le donneur ;

- la lecture en temps résolu permet de supprimer les effets de l'auto-fluorescence des cellules et des produits à tester ;

- l'amplitude des signaux en TR-FRET est plus élevée que celle mesurée avec des techniques de FRET utilisant des colorants/protéines fluorescentes.

La technique de TR-FRET n'a jusqu'à présent jamais été utilisée dans des cellules vivantes. Cela est dû à de nombreux obstacles techniques que la Demanderesse a pu surmonter.

Un des problèmes techniques majeur pour mettre en œuvre cette technique dans une cellule vivante réside dans le fait que la plupart des composés fluorescents sont souvent très hydrophiles et ne traversent pas la membrane plasmique. Un autre problème est lié au fait que ces composés sont sensibles à leur environnement et en particulier leur rendement de fluorescence peut être très affecté dans un milieu biologique. Enfin, la Demanderesse a dû surmonter un autre obstacle afin de marquer des bio-molécules présentes dans la cellule par des composés fluorescents introduits à l'extérieur de la cellule, et ce sans affecter l'intégrité biologique des cellules.

Le procédé de l'invention permet de contourner ces obstacles et fournit donc des moyens efficaces pour étudier des phénomènes biologiques à l'intérieur de cellules vivantes.

Le procédé de l'invention permet la détection et la quantification d'interactions ou de modifications de conformation entre bio-molécules sur cellules vivantes en réponse à une stimulation spécifique.

L'invention concerne un procédé de détection d'interactions entre bio-molécules, de translocation ou de changement de conformation de bio-molécules dans des cellules vivantes, comprenant les étapes suivantes qui consistent à :

1) marquer une première bio-molécule, dans la cellule vivante, avec un premier composé fluorescent possédant une durée de vie de fluorescence longue ;

2) marquer, dans la cellule vivante, au moins une deuxième bio-molécule avec un deuxième composé fluorescent ;

3) soumettre les cellules vivantes à une stimulation spécifique adaptée à la réponse biologique à étudier, en présence ou non d'une librairie de molécules à activité pharmacologique (candidats potentiels pour de futurs médicaments) à tester ;

4) soumettre les cellules vivantes à une source lumineuse ayant une longueur d'onde permettant l'excitation dudit premier composé fluorescent à durée de vie longue ;

5) mesurer l'intensité de la fluorescence émise par lesdits premier et second composés fluorescents, et calculer le rapport entre les intensités de fluorescence dudit premier composé fluorescent et dudit second composé fluorescent, ou mesurer la durée de vie du premier ou du second composé fluorescent ;

6) comparer les signaux mesurés à ceux obtenus avant stimulation des cellules.

L'excitation lumineuse des cellules vivantes peut être réalisée par des procédés bien connus de l'homme du métier, tels que par une source laser, des lampes flash ou au Xénon.

Les mesures d'émission, d'intensité et de durée de vie des différents composés fluorescents utilisés dans la méthode de l'invention sont réalisées aux moyens des signaux FRET par des méthodes conventionnelles bien connues de l'homme du métier. Les lecteurs appropriés pour détecter le signal de FRET en temps résolu selon la méthode de l'invention sont du type RUBYstar ou PHERAstar de chez BMG Labtech ou d'autres lecteurs compatibles avec le temps résolu tels que l'ULTRA, l'ULTRA Evolution ou le GENios Pro de chez TECAN ou l'Analyst de chez Molecular Devices. Le calcul du rapport entre la fluorescence du premier composé fluorescent et la fluorescence du second composé fluorescent ou des autres (dans le cadre d'une analyse en multiplexing) s'effectue par une méthode connue par l'homme du métier et décrite notamment dans EP 569 496 B1.

Les fluorophores utilisés pour marquer les bio-molécules sont des composés fluorescents partenaires de TR-FRET. Selon l'invention, on entend par « composés fluorescents partenaires de TR-FRET », des paires de composés fluorescents dont les spectres de fluorescence se recouvrent partiellement, et dont le donneur est un composé fluorescent à durée de vie longue et l'accepteur est un composé fluorescent à durée de vie plus courte que le donneur. L'homme du métier est à même de sélectionner des couples de composés fluorescents partenaires de TR-FRET pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention.

Dans une mise en œuvre alternative du procédé selon l'invention, et dans le cas où l'on souhaite étudier des changements de conformation d'une bio-molécule dans la cellule, les deux composés fluorescents sont utilisés pour marquer une seule et même

bio-molécule.

Selon une variante de mise en œuvre, le procédé selon l'invention comporte des étapes additionnelles de marquage de bio-molécules avec d'autres composés fluorescents, ce qui permet d'étudier des phénomènes biologiques plus complexes. Dans ce cas, le système comportera toujours un premier composé fluorescent donneur à durée de vie longue, ainsi que plusieurs autres composés fluorescents accepteurs partenaires de TR-FRET, ce qui permettra de mesurer plusieurs interactions, translocations ou changement de conformation dans une même cellule.

Les bio-molécules

Par bio-molécule, on entend une molécule présente dans un organisme vivant, et en particulier les molécules constituant la structure d'un organisme, celles impliquées dans la production et la transformation d'énergie ou dans la transmission des signaux biologiques. Cette définition englobe les acides nucléiques, les protéines, les sucres, les lipides, les peptides, les oligonucléotides, les intermédiaires métaboliques, les enzymes, les hormones et les neurotransmetteurs.

Les bio-molécules qui peuvent être étudiées à l'aide du procédé selon l'invention sont tous les types de molécules exprimées, grâce à des techniques d'expression hétérologues connues par l'homme du métier, dans des cellules vivantes en culture. Ces bio-molécules peuvent être par exemple, toutes protéines, tous lipides, sucres ou oligo-nucléotides artificiellement produits par les cellules vivantes, comme par exemple les récepteurs membranaires, tels que les récepteurs à tyrosine kinase, les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G et sous-unités des protéines G hétéro-trimériques, les récepteurs non-membranaires, tels que les récepteurs aux hormones, les canaux ioniques, les transporteurs présents à la membrane (les aquarines, les transporteurs sodium, les transporteurs bicarbonate (HCO_3), les pompes ioniques (pompe sodium/potassium), les protéines de la transduction du signal, telles que les protéines G monomériques, les enzymes, telles que les kinases, les phosphatases, les transglutaminases, les hydrolases, les halogénases, les lipases, les transférases, les enzymes du métabolisme, les protéines d'échafaudage, telles que SOS, GRB, IRS, HSP, les protéines de liaison aux lipides, les protéines contenant des domaines PH, ou FYVE, s'associant à la membrane par ancrage lipidique du type N-myristoylation, S-palmitoylation, S-prénylation géranylgeranylation, les protéines

associées aux récepteurs couplés aux protéines G (monomériques ou trimériques) telles les GEFs, GAPs et RGS, les sous-unités des protéines G hétéro-trimériques et les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les protéines adaptatrices telles que les protéines contenant les domaines SH2, SH3, les facteurs de transcription tels c-fos, c-jun, CREB, les protéines mitochondriales (telles que les protéines de la chaîne respiratoire, les cytochromes C, les caspases, le PBR ...), les phospholipides, les protéines nucléaires telles que les polymérases à DNA, les hélicases, les topoisomérases, les protéines de la famille des récepteurs dits "de mort", telles que FAS, les protéines de l'apoptose, telles que celles de la famille de bcl-2, les protéines du cycle cellulaire, telles que les cdk et les cyclines.

Les cellules vivantes

Les cellules vivantes utilisées dans la présente invention sont tous les types de cellules vivantes mises en culture selon des techniques connues par l'homme du métier, comme par exemple, les cellules procaryotes (bactéries), les levures, les lignées de cellules eucaryotes immortalisées, les cellules d'insectes, les cultures primaires, telles que des cultures provenant du sang, de tissus ou d'organes de mammifères. Il est important de souligner que le procédé de l'invention permet de travailler sur des cellules vivantes et de conserver l'intégrité des mécanismes biochimiques intracellulaires : les membranes cellulaires ne sont pas perméabilisées comme c'est le cas dans d'autres procédés de l'état de la technique et les cellules n'ont pas besoin d'être fixées.

Les interactions entre molécules pouvant être mis en évidence par le procédé selon l'invention sont nombreuses et variées et elles sont dépendantes de la nature des bio-molécules utilisées dans ledit procédé. Ces interactions peuvent être, par exemple, les interactions entre le récepteur androgène et l'androgène qui induisent une translocation du récepteur du cytoplasme vers le noyau cellulaire, de la PKC- γ qui subit une translocation après stimulation du cytoplasme vers les lipides composant la membrane plasmique cellulaire, du complexe calcineurine qui nécessite une liaison avec la calmoduline pour être active, de p65/p50, etc.

Les changements de conformation de bio-molécules au sein même de la cellule vivante peuvent avoir lieu dans certaines circonstances de stimulation, ces modifications peuvent être, par exemple, la béta-arrestine, EPAC (protéines liant le

cAMP), les facteurs d'échange des petites protéines G monomériques, (GEFs), les canaux ioniques, tels que les canaux K⁺ dépendants du potentiel à inactivation rapide, etc.

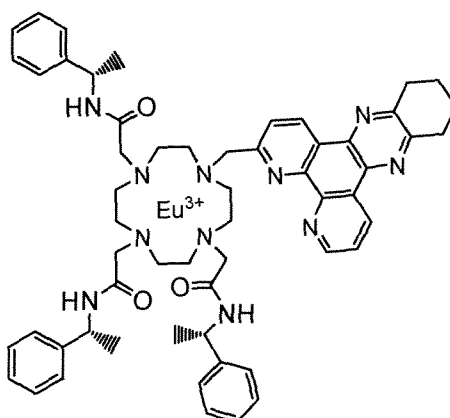
Les composés fluorescents

Plusieurs composés fluorescents, également dénommés fluorophores, sont utilisés dans le procédé de l'invention, le premier de ces composés possède une durée de vie de fluorescence longue et les autres des durées de vie de fluorescence généralement courtes. Dans tous les cas, les composés fluorescents sont des partenaires de TR-FRET.

Les composés fluorescents à durée de vie longue particulièrement appropriés aux fins de l'invention ont de préférence une durée de vie égale ou supérieure à 100 nanosecondes.

Plus précisément ces composés fluorescents appropriés sont des complexes de terre rare, tels que les cryptates et les chélates, en particulier les cryptates comportant un ou plusieurs motifs pyridine. De tels cryptates de terre rare sont décrits par exemple dans les brevets EP 180 492, EP 321 353, EP 601 113 et WO 01/96 877. Les cryptates de Terbium (Tb³⁺) et d'Europium (Eu³⁺) sont particulièrement appropriés aux fins de la présente invention. Les chélates de terres rares sont décrits notamment dans les brevets US 4 761 481, US 5 032 677, US 5 055 578, US 5 106 957, US 5 116 989, US 4 761 481, US 4 801 722, US 4 794 191, US 4 637 988, US 4 670 572, US 4 837 169, US 4 859 777. D'autres chélates sont composés d'un ligand nonadenté tel que la terpyridine (EP 403 593, US 5 324 825, US 5 202 423, US 5 316 909).

Un exemple particulier de chélate de terre rare qui convient aux fins de l'invention est le chélate ayant la formule :



La synthèse de ce composé qui peut être utilisé comme membre donneur d'un couple de partenaires de FRET, est décrite par Poole R. et al. Org. Dans Biomol. Chem, 2005, 3, 1013-1024 "Synthesis and characterisation of highly emissive and kinetically stable lanthanide complexes suitable for usage in cellulo". L'exemple 6 ci-après montre que ce type de composé peut être utilisé pour quantifier des signaux en temps résolu dans la cellule.

Les composés fluorescents ayant une durée de vie courte peuvent être sélectionnés parmi les protéines fluorescentes, telles que la protéine fluorescente verte (GFP) et ses dérivés (notamment CFP, YFP), ou des composés fluorescents ayant des durée de vie inférieure à 100 nanosecondes, telles que les cyanines, les rhodamines, les fluorescéines, les squarènes et les molécules fluorescentes connues sous le nom de BODIPY's (difluoroboradiaindacenes), les composés connus sous la dénomination AlexaFluor, les protéines fluorescentes extraites de coraux, les phycobiliprotéines, telles que la B-phycoérythrine, la R-phycoérythrine, la C-phycoyanine, les allophycocyanines, en particulier celles connues sous la dénomination XL665, les "Quantum Dots". D'autres composés fluorescents appropriés sont décrits dans la demande de brevet FR 2 840 611 et comprennent un fluorophore couplé à un oligonucléotide.

Marquage des molécules biologiques par les composés fluorescents

Les différentes méthodes de marquage des bio-molécules par des composés fluorescents sont détaillées ci-dessous.

1) Génération d'une protéine de fusion entre la / les bio-molécules d'intérêt et une protéine possédant des propriétés intrinsèques de fluorescence, telles que les protéines de la famille des GFP. L'expression de telles protéines de fusion fait appel à des techniques de biologie moléculaire bien connues de l'homme du métier, consistant par exemple à transfecter dans la cellule vivante, de manière stable ou transitoire, des vecteurs d'expression, tels que des plasmides, dont l'ADN code pour la protéine de fusion.

2) Génération d'une protéine de fusion entre la / les bio-molécules d'intérêt et une protéine possédant une activité enzymatique suicide, telles que par exemple les protéines SnapTag (Covalys) ou HaloTag (Promega) qui transfèrent de façon covalente et irréversible le composé fluorescent sur la / les bio-molécules d'intérêt. Le composé

fluorescent est dans ce cas lié de manière covalente au substrat de l'enzyme suicide et est introduit dans le milieu extracellulaire. Les techniques décrites ci-après permettent de faire franchir la membrane cellulaire aux conjugués composé fluorescent – substrat qui ne seraient pas naturellement lipophiles.

Les enzymes suicides sont des protéines qui ont une activité enzymatique modifiée par des mutations spécifiques qui leur confèrent la capacité de lier rapidement et de façon covalente un substrat. Ces enzymes sont dites suicides car chacune ne peut lier qu'une seule molécule fluorescente, l'activité de l'enzyme étant bloquée par la fixation du substrat. Actuellement deux familles d'enzymes suicides connues permettent ce type de marquage :

- le mutant d'une alkylguanine-DNA alkyltransférase (ou SnapTag commercialisé par la société Covalys) (voir Klepper A. et al. (2003) in Nature Biotechnology, vol. 21, p. 86 et WO 02/083937 A2), dont un des substrats est la benzylguanine.

- le mutant d'une déhalogénase (HaloTag commercialisé par Promega) qui génère également une réaction enzymatique du type suicide (voir WO 04/072232 A2), dont certains des substrats sont des composés de la famille des chloroalcanes.

Dans ces deux cas, le substrat qui sera incorporé par ces enzymes suicides devra au préalable être marqué avec un composé organique fluorescent.

3) Génération d'une protéine de fusion entre la/les bio-molécules d'intérêt et une séquence retrouvant une activité d'épissage protéique après liaison avec une séquence complémentaire préalablement marquée avec le/les molécules fluorescentes d'intérêt transférant ainsi de façon covalente et irréversible par une liaison peptidique le composé fluorescent sur la/les bio-molécules cibles, telles que la séquence codant pour le domaine intéine de la Ssp DnaE.

Cette approche exploite un procédé biologique de maturation post-traductionnelle, appelé épissage protéique. Ce procédé catalyse une série de réactions chimiques qui a pour but final d'enlever un domaine nommé intéine présent dans une protéine précurseur et de lier par une liaison peptidique les deux domaines se trouvant de part et d'autre du domaine intéine. Le trans-épissage protéique nécessite deux moitiés de domaine intéine complémentaire. La première moitié est fusionnée à la protéine cible et la seconde moitié à la molécule fluorescente. Cette méthode est décrite par Muir T.W. et al. (2003) J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 7180-7181. Les techniques décrites ci-après permettent de faire franchir la membrane cellulaire aux

conjugués "composé fluorescent – intéine" qui ne seraient pas naturellement lipophiles.

4) Génération d'une protéine de fusion entre la/les bio-molécules à étudier et une séquence peptidique ou un membre d'un couple de partenaires de liaison possédant des caractéristiques de reconnaissance spécifique et de liaison à haute affinité avec un substrat préalablement marqué avec le /les molécules fluorescentes d'intérêt telles que par exemple :

- Les séquences cystéine-cystéine-X-X-cystéine-cystéine (CCXXCC) qui ont la propriété de se lier à des composés bi-arsenic. Ces composés bi-arsenic peuvent être facilement marqués avec une molécule organique du type fluorescéine ou rhodamine (voir B.A.Griffin et al. (1998) Science. 1998, 281, 269-271 et S.A. Adams et al. (2002) J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 6063-6076 pour des détails sur la technologie).

- Les répétitions Poly histidine se lient à des ions métalliques qui peuvent être couplés à des molécules "quencheurs" de composés fluorescents (voir E.G. Guignet et al. (2004), Nature biotech., 2004, 22, 440-444).

- Le Tag BTX (bungarotoxine), composé d'un peptide de 13 acides aminés qui est reconnu par la bungarotoxine (BTX), peut être préalablement couplé à une molécule fluorescente. (voir C. M. McCann et al. (2005), Biotechnique (2005), 38, 945-952).

- La séquence de liaison de la Streptavidine (SBP-Tag) est une séquence formée par 38 acides aminés qui présente une haute affinité pour la biotine pouvant être préalablement marquée avec un fluorophore (voir C. M. McCann et al. (2005), Biotechnique (2005), 38, 945-952).

5) Génération d'une protéine de fusion entre la / les bio-molécules à étudier et une séquence peptidique de reconnaissance de certaines enzymes comme, par exemple, les transglutaminases ou les ligases qui transfèrent sur un acide aminé spécifique de la séquence Tag le composé fluorescent préalablement fixé sur le substrat de l'enzyme.

La séquence peptidique PKPQQFM (Proline-Lysine-Proline-Glutamine-Glutamine-Phénylalanine-Méthionine) est par exemple reconnue par une enzyme nommée transglutaminase. La transglutaminase transfère le composé organique fluorescent couplé à son substrat, la cadaverine, directement sur le premier résidu glutamine de la séquence PKPQQFM (voir Taki et al (2004) Protein Engineering, Design Selection, 2004,17, 119-12). Les techniques décrites ci-après permettent de faire franchir la

membrane cellulaire aux conjugués composé fluorescent – substrat qui ne seraient pas naturellement lipophiles. La séquence de l'enzyme dihydrofolate réductase d'E. coli (eDHFR) qui lie spécifiquement et avec une haute affinité des ligands tels que la triméthoprine sur lesquels peuvent être greffés des composés fluorescents selon la technologie dénommée « Ligand link Universal labelling technology » de la Société Active Motif.

6) Des séquences nucléiques peuvent être elles aussi spécifiquement reconnues par des enzymes ayant des activités transférases leur permettant de lier de façon covalente une molécule organique fluorescente présente sur un cofacteur ou un substrat directement sur la séquence spécifique. Un tel procédé peut être illustré par la séquence nucléique spécifique 5'-TCGA-3' sur laquelle la méthyltransférase Taq1 transfère le composé fluorescent préalablement greffé sur le cofacteur aziridine (voir Pljevaljic G. et al. (2004) ChemBioChem, 5; 265-269).

Dans le procédé selon l'invention, le marquage composé fluorescent / bio-molécule est donc effectué en couplant le composé fluorescent et la bio-molécule, respectivement avec les membres des couples choisis parmi : un substrat de SNAP-Tag/l'enzyme SNAP-Tag, un substrat d'HALO-Tag/l'enzyme HALO-Tag, une partie d'intéine telle que l'intéine de Ssp DnaE / la partie d'intéine complémentaire permettant de reconstituer une intéine fonctionnelle, un motif bi-arsenic / la séquence Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, X représentant un acide aminé quelconque, un ion métallique / une séquence poly-histidine, la biotine / la streptavidine, la streptavidine / la biotine, la bungarotoxine / le tag BTX, la cadavérine / la séquence protéique PKPQQFM, l'aziridine / la séquence nucléique TCGA.

Les techniques de marquage citées ci-dessus impliquent parfois de faire franchir la membrane cellulaire à des composés qui ne sont pas naturellement lipophiles et qui ne rentrent pas naturellement dans la cellule. Ces composés ou leurs conjugués avec des substrats, des étiquettes ("tags"), ou des membres d'un couple de partenaires de liaison tels que décrits plus haut, peuvent être introduits dans la cellule en utilisant par exemple l'une des techniques suivantes :

1). Utilisation d'esters qui masquent les groupes chargés pendant le passage de la bicouche lipidique ; ces esters rentrent dans la catégorie des composés nommés pro-drogues et font référence à des composés qui sont rapidement transformés in vivo pour donner le composé « parent » suite à une hydrolyse dans des conditions

physiologiques. [T. Higuchi et V. Stella in "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975)]. Des exemples incluent principalement les groupes pivaloyl-oxyméthyle, acétoxyméthyle ainsi que esters glycoliques [Nielsen et Bundgaard, *Int. J. of Pharmacy*. 39(1984) 75-85]. Lorsque cette technique est utilisée, un de ces groupements est greffé de manière covalente sur le fluorophore.

2). Utilisation de peptides viraux greffés de manière covalente au fluorophore : certains de ces peptides permettent en effet de véhiculer le fluorophore à travers la membrane cellulaire. A titre d'exemple de tels peptides viraux, on peut citer les analogues de « penetratine » et « transportan » [Langel et al. *Bioconj. Chem.* (2000), 11, 619-626], les poly-Arginines [Wender et al. *Arginine-based molecular transporters*. *Org. Lett.* (2003), 5(19), 3459-3462], ou encore les peptoïdes, analogues de peptides portant des groupes guanidines [The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. Wender et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2000), 13003-8], ou encore les dérivés non-hydrolysables à motifs tétraganidinium [Fernandez-Carneado J. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 869-874]

3). Modification de la lipophilie et de la polarité des composés fluorescents par l'addition de chaînes latérales contenant des molécules de cholestérol, de vitamine E ou des chaînes aliphatiques qui interagissent avec les membranes cellulaires en utilisant l'approche exemplifiée sur les oligonucléotides utilisant des chaînes undécyl- ou 1,2-di-O-hexadécyl-glycérol. [3'-end conjugates of minimally phosphorothioate-protected oligonucleotides with 1-O-hexadecylglycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells. Rait et al. *Bioconj. Chem.* (2000), 11, 153-160].

Ces modifications sont plus efficaces que les surfactants cationiques (cationic "lipids") qui forment des complexes supramoléculaires avec les acides nucléiques et augmentent l'endocytose mais qui sont toxiques et endommagent les membranes cellulaires.

Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, au moins un composé fluorescent comporte un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique, ce motif étant sélectionné parmi les groupes suivants : esters tels que les pivaloyl-oxyméthyle ester, acétoxyméthyle ester, ou les esters glycoliques ; des peptides viraux pris en charge par des transporteurs membranaires, tels que la pénétratine et ses

analogues, le transportan et ses analogues, les groupes polyarginines, les peptoides portant des groupes guanidines, tel que les groupes oligoguanidinium; des groupes cholestérol, vitamines E ou des chaînes aliphatiques, telles que les chaînes undécyle ou 1,2-di-O-hexadécyl-glycérol.

Dans une mise en œuvre alternative, au moins deux composés fluorescents partenaires de TR-FRET comportent de tels motifs leur permettant de franchir la membrane plasmique.

De manière avantageuse, on peut lier le composé fluorescent au substrat de l'enzyme suicide et générer en même temps sur ledit composé fluorescent une fonction chimique réactive, telle que notamment une fonction amine ou acide qui permet ultérieurement de coupler sur ledit composé fluorescent un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique.

A titre d'exemples, on pourra se référer aux figures 7 et 8 qui illustrent la synthèse d'un conjugué entre un composé fluorescent, le composé DY647 (de la Société DYOMICS) et le substrat d'une enzyme suicide (substrat de l'enzyme « SnapTag »), à savoir la benzylguanine sur laquelle on a ajouté un groupe fonctionnel amine et l'introduction d'une fonction chimique réactive sur ledit composé fluorescent (ce conjugué est ci-après dénommé « tripode »).

On peut ultérieurement, grâce à cette fonction chimique réactive, introduire par liaison covalente, ledit motif permettant de franchir la membrane plasmique.

Le tripode avec une fonction NH_2 permettra d'intégrer les systèmes vecteurs possédant une fonction COOH et celui avec une fonction COOH permettra d'intégrer les systèmes vecteurs possédant une fonction NH_2 .

L'invention fournit également un nécessaire de composants (communément appelé "kit of parts" en langue anglaise) comprenant les réactifs permettant la mise en œuvre du procédé de détection d'interactions entre bio-molécules, de translocation ou de changement de conformation de bio-molécules dans des cellules vivantes selon l'invention.

Ce nécessaire (ou kit) comprend :

- un premier composé fluorescent et un second composé fluorescent, ces composés étant partenaires de TR-FRET et l'un au moins de ces composés comportant un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique ;
- des cellules vivantes comprenant lesdites bio-molécules ;

- des moyens de marquage des bio-molécules par les composés fluorescents ;
- des instructions permettant d'étudier des phénomènes d'interactions entre bio-molécules, de translocation ou de changement de conformation de bio-molécules dans des cellules vivantes.

Les réactifs présents dans ce nécessaire permettent le marquage des bio-molécules à étudier présentes dans la cellule vivante par les composés fluorescents partenaires de TR-FRET : en pratique, cela signifie que le composé fluorescent et la bio-molécule sont couplés, respectivement avec les membres des couples choisis parmi : un substrat de SNAP-Tag tel que la benzylguanine/ l'enzyme SNAP-Tag, un substrat d'HALO-Tag tel qu'un chloroalcane/ l'enzyme HALO-Tag, une partie d'intéine telle que l'intéine de Ssp DnaE / la partie d'intéine complémentaire permettant de reconstituer une intéine fonctionnelle, un motif bi-arsenic / la séquence Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, X représentant un acide aminé quelconque, un ion métallique / une séquence poly-histidine, la biotine / la streptavidine, la streptavidine / la biotine, la bungarotoxine / le tag BTX, la cadaverine / la séquence protéique PKPQQFM, l'aziridine / la séquence nucléique TCGA.

Au moins un des composés fluorescents comporte par ailleurs un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique, et ce motif est choisi parmi les composés suivants : les esters tels que les pivaloyl-oxyméthyle ester, acétoxyméthyle ester, ou les esters glycoliques ; des peptides viraux pris en charge par des transporteurs membranaires tels que la penetratine et ses analogues, le transportan et ses analogues, les groupes polyarginines, les peptoïdes portant des groupes guanidines ; des groupes cholestérol, vitamines E ou des chaînes aliphatiques telles que les chaînes undécyl ou 1,2-di-O-hexadécyl-glycérol.

Les cellules vivantes comprises dans ce nécessaire peuvent être génétiquement modifiée de manière à exprimer des bio-molécules dont on veut étudier l'interaction. ces modifications font appel aux techniques classiques de biologie moléculaire bien connues de l'homme du métier, telle que la transfection stable ou transitoire des cellules par des plasmides exprimant les bio-molécules, ou des protéines de fusion comprenant les bio-molécules d'intérêt.

Les fluorophores partenaires de TR-FRET présent dans le nécessaire selon l'invention sont un composé fluorescent à durée de vie longue et au moins un composé fluorescent choisi parmi les suivants : les protéines fluorescentes telles que la protéine

fluorescente verte (GFP) et ses dérivés (notamment CFP, YFP), ou des composés fluorescents ayant des durée de vie inférieure à 100 nanosecondes, telles que les cyanines, les rhodamines, les fluorescéines, les squarènes et les molécules fluorescentes connues sous le nom de BODIPY's (difluorobora-diaza indacenes), les composés connus sous la dénomination AlexaFluor, les protéines fluorescentes extraites de coraux, les phycobiliprotéines, telles que la B-phycoérythrine, la R-phycoérythrine, la C-phycoyanine, les allophycocyanines, en particulier celles connues sous la dénomination XL665.

De manière préférée, le composé fluorescent à durée de vie longue a une durée de vie supérieure à 100 ns et de manière encore plus préférée est un chélate ou un cryptate de terre rare. Dans une formulation particulière du nécessaire selon l'invention, la terre rare est le terbium ou l'euporium.

La présente invention peut être maintenant décrite plus en détail par les exemples illustratifs suivants, qui ne doivent en aucun cas limiter les applications de la présente invention.

Exemple N°1: Mesure de la translocation de la protéine kinase C -gamma (PKC- γ) (Voir schéma de principe, Fig. 1)

Les protéines kinases C sont des protéines appartenant à un groupe de kinases sérine/thréonine dépendantes des phospholipides. Ces protéines jouent un grand rôle dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Physiologiquement la PKC- γ est activée d'une manière dépendant au calcium par les phosphoditylsérines (PS) et elle lie le diacylglycérol (DAG), mais la PKC- γ peut être activée indépendamment de la présence de DAG par les esters de phorbol inducteur de tumeurs (PMA).

Après stimulation, la PKC- γ subit une translation du cytoplasme vers la membrane plasmique, cette translocation peut être mesurée à l'aide d'une protéine de fusion avec la GFP après une stimulation au PMA (Sakai N. J. Cell Bio. (1997) 139, 1465-1476).

On a créé une protéine de fusion entre la PKC- γ et une enzyme suicide, nommée HaloTag, pour marquer la PKC- γ avec un composé organique fluorescent accepteur et on a élaboré un outil pour faire un marquage spécifique de la membrane plasmique

avec un composé organique fluorescent donneur pouvant entrer en FRET avec la PKC- γ marquée.

La membrane plasmique est spécifiquement marquée avec une enzyme suicide, nommée SnapTag fusionnée avec une séquence Cys-Ala-Ala-X (X est un acide aminé quelconque) qui est une séquence de reconnaissance pour les enzymes de modification post-traductionnelle. Cette séquence va provoquer le greffage d'un groupe farnésyl en C-terminal de l'enzyme Snaptag, qui a pour conséquence l'adressage et l'ancrage de cette enzyme sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Des cellules COS-7 ont été transfectées de façon transitoire avec les deux constructions plasmidiques avec de la lipofectamine 2000 ou par électroporation.

24 h ou 48h après la transfection transitoire, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec du milieu cellulaire contenant 5 μ M de chaque substrat spécifique des enzymes HaloTag et SnapTag, chacun des substrats étant porteur des molécules organiques fluorescentes formant le FRET.

Après 3 lavages avec du milieu, la translocation est mesurée par TR-FRET après induction par différentes stimulations comme par exemple après addition de 12-myristate 13-acétate phorbol ester (PMA). Une augmentation du signal TR-FRET est corrélée avec une augmentation du processus de translocation.

Des molécules potentiellement inhibitrices de la voie de translocation de la PKC- γ peuvent être ajoutées au milieu de culture afin de tester leurs effets sur la stimulation de la translocation.

Exemple 2 : Mise en évidence d'interactions récepteur androgène – coactivateur ou récepteur androgène – corépresseur. (voir schéma de principe figure 2)

Les androgènes et leur récepteur fonctionnel (AR) sont responsables de la différenciation normale du phénotype mâle externe. Les récepteurs des androgènes cytosoliques, à l'état inactif, sont associés avec les protéines chaperonnes (connues sous la dénomination anglaise "heat shock proteins"). Après liaison avec le ligand, les récepteurs se dimérisent et font l'objet d'une translocation vers le noyau. Les corégulateurs (coactivateurs ou corépresseurs) du AR vont alors interagir ou pas avec le récepteur et le résultat de ces interactions va éventuellement provoquer la liaison du complexe à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique (dite ARE pour « androgen

receptor responsive element ») et ainsi réguler la transcription.

La méthode selon l'invention est utilisée pour mettre en évidence les interactions entre un corépresseur, un coactivateur, et un AR. Pour cela, des vecteurs d'expression sont introduits dans la cellule, afin d'exprimer dans le milieu intracellulaire :

- une protéine de fusion AR-enzyme SnapTag. L'enzyme suicide Snaptag permet le couplage avec un composé fluorescent marqué avec un substrat de snaptag.

- une protéine de fusion HDAC1-Halotag. HDAC1 (histone acétyltransférase 1) est un corépresseur susceptible de se fixer sur AR. L'enzyme suicide halotag permet le couplage avec un composé fluorescent marqué avec un substrat d'halotag.

- une protéine de fusion p160-fragment intéine. P160 est un coactivateur de susceptible de se fixer sur AR. Le fragment d'intéine permet le couplage avec un composé fluorescent comportant le fragment d'intéine complémentaire par transépissage protéique.

Lorsque l'AR se localise dans le noyau après stimulation, (liaison de son ligand), on peut doser son effet final en mesurant le signal de TR-FRET : l'AR est marqué avec le composé fluorescent donneur et le coactivateur et le corépresseur avec deux composés fluorescents accepteurs bien distincts dans leur propriétés spectrales, et dont la longueur d'onde d'émission suite à un transfert d'énergie est respectivement 665 et 780 nm.

La mesure d'un signal de TR-FRET à 665 nm sera donc représentative de la liaison de l'AR avec son coactivateur, alors que la mesure d'un TR-FRET à 780 nm sera significative d'une interaction AR-corépresseur. Ce format d'essai permet donc la détection de deux types d'interaction dans un seul et unique essai cellulaire. Cet essai de multidétection peut être encore amélioré par l'addition d'autres composés fluorescents accepteurs pour révéler simultanément d'autres interactions.

Exemple 3 : Bio-senseur cAMP : Détection de modifications de la conformation d'une protéine de fusion comprenant un domaine de liaison à l'AMPc (Voir schéma de principe, Fig. 3)

Dans cet exemple, on mesure les variations du signal TR-FRET d'une paire de composés fluorescents donneur / accepteur en couplant ces fluorophores à un domaine de liaison à l'AMPc (comme par exemple celui de la sous unité régulatrice β II de la PKA, celui des protéines d'échange activées par la cAMP) connues sous le terme

de CAMPS. Ces constructions moléculaires peuvent être utilisées pour quantifier dans des cellules vivantes les niveaux d'AMPc après stimulation pharmacologique d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) (voir (Nikolaev et al., JBC, vol. 279, N°36, pp. 37215-37218, 2004)).

Le plasmide codant pour une protéine de fusion de type SNAP-tag / CAMPS / Halo-tag est transfecté dans des cellules HEK. 24 heures ou 48 heures après la transfection, les cellules sont incubées (1 heure à 37°C) avec les substrats de SNAP-Tag et HALO-Tag, chacun étant couplé à un membre d'un couple donneur / accepteur de TR-FRET.

A l'issue de l'étape d'incubation, les fluorophores sont couplés de manière covalente via les réactions suicides des enzymes SNAP-Tag et HALO-Tag, et la protéine CAMPS est marquée par la paire de fluorophores impliqués dans le TR-FRET.

A l'état basal, un signal de TR-FRET est mesuré en raison de la proximité des fluorophores. Après stimulation pharmacologique (par exemple stimulation par un agoniste d'un récepteur couplé aux protéines Gs exprimé dans des cellules HEK), la concentration intracellulaire d'AMPc va augmenter et la liaison de cAMP à CAMPS va provoquer un changement de conformation de cette dernière protéine. On observe alors une diminution du signal de TR-FRET mesuré.

Cet exemple montre que l'amplitude du signal de TR-FRET est directement corrélée à la liaison de l'AMPc à la protéine CAMPS.

La même expérience peut être menée avec un antagoniste du GPCR, qui provoque une diminution de la concentration d'AMPc dans la cellule et une variation de la conformation de la protéine CAMPS qui peut être détectée en mesurant une augmentation du signal de TR-FRET.

Exemple 4 : Mesure de l'interaction calcineurine / calmoduline (voir schéma de principe figure 4)

La calcineurine possède une activité de phosphatase et joue un rôle fondamental dans la voie de signalisation cellulaire impliquant les niveaux de calcium intracellulaire. La calcineurine est impliquée dans le développement et l'adaptation au stress chez les mammifères, et ce par l'intermédiaire de deux classes de facteurs de transcription : NFAT et MEF2.

La calcineurine est un hétérodimère comprenant deux sous-unités, la calcineurine

A (CnA) et la calcineurine B (CnB). L'enzyme est inactive sous sa forme hétérodimérique et l'activité phosphatase est stimulée par la formation d'un complexe calcineurine-calmoduline lors de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire.

Un plasmide codant pour une protéine de fusion comprenant la sous-unité CnA et l'enzyme HALO-Tag et un plasmide codant pour une protéine de fusion comprenant la calmoduline et l'enzyme SNAP-Tag sont *co-transfectés dans des cellules en utilisant la lipofectamine 2000* ou par électroporation. Après 24 ou 48 heures, les cellules sont incubées 1 heure à 37°C dans un milieu comprenant les substrats des enzymes SNAP-Tag et HALO-Tag, chacun couplé à un membre d'une paire de fluorophores compatible pour le TR-FRET.

Après lavage, les cellules sont stimulées pharmacologiquement ou par un stress (par exemple par la cyclosporine A, ou acidification du milieu). L'amplitude du signal de TR-FRET mesuré augmente et est corrélée à l'association de l'hétérodimère CnA-CnB avec la calmoduline.

On peut ajouter au milieu de mesure avant stimulation des molécules dont on veut tester l'effet sur l'activation de la voie de signalisation calcineurine-dépendante. Cet exemple montre que le procédé selon l'invention permet d'étudier la voie de signalisation calcineurine dépendante dans des cellules vivantes, éventuellement en présence de composés à tester. Ce type de test permet le criblage à haut débit de composés candidates susceptibles de permettre le traitement de pathologies impliquant cette voie de signalisation.

Exemple 5 : Criblage de composés ayant une activité anti-inflammatoire

Le TNF alpha est un facteur de l'inflammation qui provoque plusieurs réponses cellulaires lors de sa liaison à son récepteur membranaire. Une des réponses provoquée par le TNF alpha dans les lymphocytes B est l'activation du facteur de transcription NFkB, qui contrôle la production des chaînes légères des anticorps – une étape critique de la réponse immunitaire. Les inhibiteurs du TNF alpha sont donc utile pour réguler la réponse immunitaire, et peuvent par exemple être utilisé dans la prévention du choc septique, ou comme médicaments anti-inflammatoires. De tels inhibiteurs de l'activité TNFalpha peuvent être découvert en mesurant le niveau d'activation de NFkB, ce que permet la présente invention.

La figure 5 illustre la rétention cytosolique de NFkB par la protéine cytosolique IkB : le complexe NFkB (p65, p50)-IkB est retenu dans le cytosol. Une stimulation appropriée (mitogènes de cellules T et B, le lipopolysaccharide, et le TNFalpha) provoque la phosphorylation de IkB, entraîne sa dégradation et libère NFkB qui peut alors pénétrer le noyau cellulaire et activer la production des chaînes légères d'anticorps.

Le procédé selon l'invention est appliqué en introduisant dans des lymphocytes B par les techniques classiques de biologie moléculaire les constructions suivantes :

- un vecteur exprimant une protéine de fusion IkB-Snaptag, qui pourra être marquée par un composé fluorescent donneur conjugué au substrat de Snaptag ;
- un vecteur exprimant une protéine de fusion p50-Halotag, qui pourra être marqué par un composé fluorescent accepteur conjugué à un substrat d'Halotag.

Dans les conditions de repos, le complexe NFkB (p65/p50) forme un complexe avec IkB et l'on peut mesurer un signal de TR-FRET. Après stimulation des cellules par le TNFalpha, la phosphorylation de IkB et sa dissociation du complexe va provoquer une diminution du signal de TR-FRET. L'amplitude de cette diminution est représentative du degré d'activation de la NFkB.

Ces cellules sont cultivées dans une plaque micropuits, et l'on applique à différents puits l'un des traitements suivants :

- ajout des composés fluorescents donneur et accepteur couplés aux substrats Snaptag et Halotag, mesure du signal de TR-FRET (puits de contrôle TR-FRET élevé) ;
- ajout des composés fluorescents couplés aux substrats Snaptag et Halotag, stimulation des cellules par ajout de TNFalpha, mesure du signal de TR-FRET (puits de contrôle TR-FRET bas) ;
- ajout des composés fluorescents couplés aux substrats Snaptag et Halotag, ajout d'un composé à tester, stimulation des cellules par ajout de TNFalpha, mesure du signal de TR-FRET (puits tests).

Lorsque le signal des puits tests est similaire à celui mesuré dans les puits de contrôle TR-FRET élevé, on peut conclure que les composés à tester ont un effet inhibiteur sur l'activité TNF alpha. Lorsque cette valeur est proche de la valeur mesurée dans les puits de contrôle TR-FRET bas, on peut conclure que les composés à tester n'ont pas d'effet sur l'action de TNF alpha.

Cet exemple illustre l'application du procédé selon l'invention au criblage de

médicaments et est particulièrement adapté au criblage dit à haut débit.

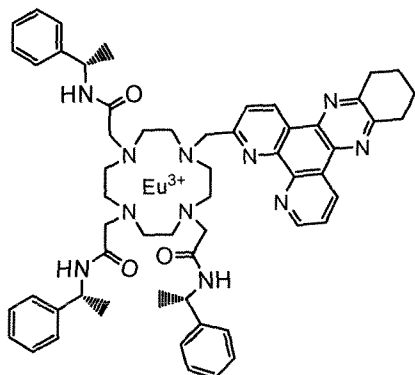
Exemple 6 : Microscopie en temps résolu d'un chélate d'euporium

Cet exemple illustre l'utilisation d'un composé fluorescent capable de franchir naturellement la membrane plasmique et sa capacité à émettre un signal en temps résolu dans une cellule.

a) Protocole

Des cellules sontensemencées dans des chambres de culture LABTEK [densité 80 000c/ml], mise en culture 24 heures puis subissent un lavage avec du milieu de culture.

Le chélate d'euporium de formule ci-dessous est rajouté au milieu de culture (concentration 20µM) et les cellules sont incubées 24 heures à 37°C.



Après lavage avec du milieu de culture, le colorant de Hoechst 33342 [concentration 2µg/ml ; référence fournisseur : Sigma Aldrich B2261] est ajouté aux chambres de culture, qui sont alors incubées 15 min. à l'abri de la lumière à température ambiante. Ce colorant à la propriété de marquer spécifiquement les noyaux cellulaires.

Les chambres de cultures sont lavées une nouvelle fois avec du milieu de culture avant de procéder à l'acquisition des images par microscopie, en mode « temps résolu », avec le matériel suivant : un microscope Axiovert 200M (Zeiss), une source d'excitation UV: un laser azote pulsé (Spectra Physics) et une caméra intensifiée CCD (charge coupled device) PI-Max (Roper Scientific), avec les paramètres suivants :

- Durée de lecture 2 millisecondes : La caméra détecte pendant 2 millisecondes

- pour récupérer tout le signal du chélate ;
- Délai 100 microsecondes : délais imposé pour éliminer la fluorescence parasite avant de capter le signal en temps résolu ;
 - Nombre de cycles par lecture : le signal est acquis pendant 30 expositions durant les 2 millisecondes puis compilé.

b) Résultats :

Les images obtenues sont représentées dans la Figure 6.

L'image en transmission (image 3) permet de s'assurer de l'intégrité des cellules et de la densité du tapis cellulaire. L'image Hoechst (Image 2) permet de localiser les noyaux cellulaires. Le contrôle négatif (image 5) montre le signal obtenu en mode de détection temps-résolu en l'absence de composé fluorescent.

L'image obtenue avec le composé fluorescent donneur testé à la concentration de 20 μM (image 1) permet de mettre en évidence une localisation intracellulaire du composé donneur de FRET. La superposition des images (2) et (1) montre que la fluorescence est localisée dans la cellule.

Ce type de mesure en temps résolu peut être quantifié en désignant des régions d'intérêt sur des zones de signaux et de bruit, et de soustraire la valeur moyenne du bruit à la valeur de signal mesuré.

Cet exemple montre qu'un chélate de terre rare capable de franchir la membrane plasmique peut être utilisé pour mettre en œuvre l'invention, et que le signal émis par un tel composé peut être mesuré par microscopie en temps résolu.

Exemple 7 : Synthèse d'un conjugué fluorescent comportant un motif polyarginine et un groupe benzylguanine, données microscopiques.

a) Synthèse de BG-DY647 et de Dy647-R9-BG

Le schéma de synthèse d'un conjugué comprenant la benzylguanine BG (substrat de l'enzyme SNAPTAG) lié de manière covalente au composé fluorescent DY647 est décrit sur la Figure 9.

La Figure 10 représente le schéma de synthèse d'un conjugué comprenant une séquence de 9 arginines (R9), sur laquelle sont greffés d'une part, le fluorophore DY647, et d'autre part la benzylguanine BG.

b) Analyse microscopique :

Des cellules CHO sont cultivées à 37 °C, sous atmosphère contrôlée à 5% CO₂ en milieu F-12 HAM (Invitrogen) + 10 % de sérum de veau foetal (SVF) préalablement inactivé pendant 20 min à 60 °C.

La veille de l'expérience les cellules sont dissociées etensemencées dans des chambres de culture LABTECK (Nunc) à une densité de 75 000 cellules/puits.

Le jour de l'expérience, les composés à tester (BG-DY647 ou Dy647-R9-BG) sont préparés dans du milieu de culture à une concentration de 5 µM et mis en contact une heure avec les cellules.

Après l'incubation, 3 lavages sont effectués avec du milieu de culture.

Avant l'analyse microscopique, une coloration nucléaire est réalisée avec du colorant Hoescht.

L'analyse microscopique se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence Axiovert 200M (Zeiss), objectif 40 X, une source d'excitation UV: un laser azote pulsé (Spectra Physics) et une caméra CCD CoolSNAP (Photometrics).

La Figure 11 montre les images obtenues avec soit le conjugué BG-DY647, soit le conjugué DY647-R9-BG. On constate que le conjugué DY647-R9-BG est localisé dans les cellules alors que le conjugué BG-DY647 reste en solution dans le milieu de culture. Un composé tel que le DY647-R9-BG peut donc être utilisé dans la méthode selon l'invention, notamment en tant que conjugué accepteur capable de traverser la membrane plasmique pour marquer une protéine intracellulaire comprenant l'enzyme SnapTag.

Exemple 8 : Exemple comparatif de l'effet d'une modification polyArginine ou oligoguanidinium sur l'entrée d'un fluorophore dans des cellules en culture, données sur lecteur de fluorescence

a) Protocole

Des cellules CHO sont cultivées à 37 °C, sous atmosphère contrôlée à 5% CO₂ en milieu F-12 HAM (Invitrogen) + 10 % de sérum de veau foetal (SVF) préalablement inactivé 20 min à 60 °C.

La veille de l'expérience, des cellules CHO-M1 sontensemencées dans une plaque 96

puits à la densité de 10 000 cellules par puit.

Le jour de l'expérience, le milieu de culture est aspiré et remplacé par les composés à tester à une concentration de 2,5 μ M ou 5 μ M dans du Tampon KREBS (Sigma). Après 1 heure d'incubation, les puits sont lavés avec un tampon KREBS+0.05 % Tween-20. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon PBS+0.1% Triton X100. La fluorescence est mesurée sur un lecteur du type Analyst AD (LJL, Molecular Devices) avec les filtres et le dichroïque adéquat aux spécificités spectrales du composé à détecter.

Exemple pour un composé porteur d'une fluorescéine :

Filtre à l'excitation : bande passante 485/22 nm

Dichroïque : passe haut 505 nm

Filtre à l'émission : bande passante 535/35 nm

Exemple pour un composé porteur d'un complexe de terre rare :

Filtre à l'excitation : bande passante 330/80 nm

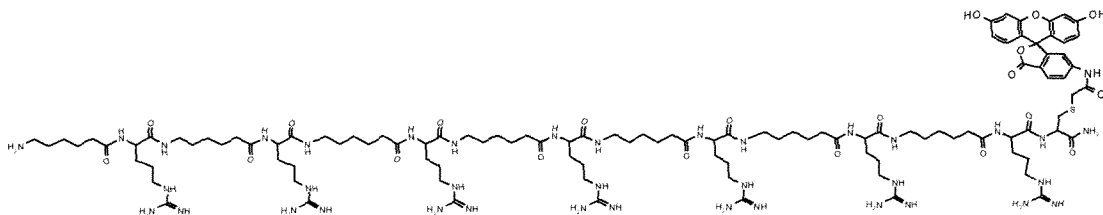
Dichroïque : BBUV

Filtre à l'émission : bande passante 620/10 nm

b) Résultats

Dans ces conditions, 4 composés ont été testés :

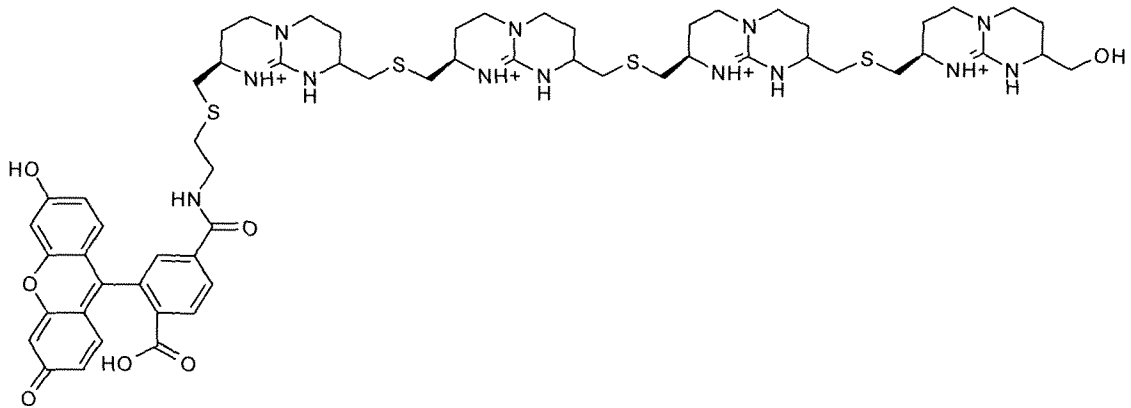
- La fluorescéine capable de franchir naturellement la membrane plasmique et la carboxyfluorescéine qui n'est pas capable de franchir naturellement la membrane plasmique *comme contrôles* ;
- le dérivé R7-fluorescéine de formule ci-dessous :



obtenu par greffage d'une séquence poly Arginine comportant 7 motifs arginine

sur la structure fluorescéine selon le schéma de synthèse décrit sur la Figure 12 ;

- Le dérivé tétraguandinium-fluorescéine : une séquence tétraguandinium (telle que décrite par Fernandez-Carneado J. et al. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 869-874.) a été greffée sur la structure carboxyfluorescéine



L'intensité de fluorescence mesurée pour chacun des composés (Figure 13) selon le protocole ci-dessus montre que les séquences poly Arginine et tétraguandinium peuvent être utilisées pour faire entrer dans la cellule l'un des partenaires de FRET, et donc en tant que motif permettant à l'un des partenaires de FRET de traverser la membrane cellulaire.

Exemple 9 : Exemple de TR-FRET intracellulaire constitutif (caméléon HaloTag- SnapTag)

La méthode selon l'invention est utilisée pour mettre en évidence un signal de FRET dans une cellule vivante. Pour cela, un vecteur d'expression est introduit dans la cellule, afin d'exprimer dans le milieu intracellulaire une protéine de fusion composée du SnapTag et de l'HaloTag. L'enzyme suicide SnapTag permet le couplage avec un composé fluorescent marqué avec un substrat de SnapTag (la benzylguanine). L'enzyme suicide Halo-tag permet le couplage avec un composé fluorescent marqué avec un substrat de l'Halo-tag (un chloroalcane).

Obtention de la construction plasmidique pour l'expression cellulaire d'une protéine de fusion SnapTag-HaloTag :

Le plasmide pHT2 portant la séquence de l'HaloTag provient de la société Promega.

Le plasmide pSem-S1-ST26m portant la séquence du SnapTag provient de la société Covalys.

La cassette correspondant à la séquence codante de l'HaloTag est isolée du plasmide pHT2 par digestion enzymatique EcoRV-Not I (Biolabs) et transférée dans le plasmide pCDNA3.1 (Invitrogen) préalablement digéré par les mêmes enzymes.

La ligation est faite par de la T4 Ligase (Invitrogen). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries chimiocompétentes Turbo cells (GenetherapySystem). Les bactéries transformées sont étalées sur du milieu LB-Agar (Sigma) + 0.1 mg/ml d'ampiciline (Eurogentec) permettant la sélection des bactéries possédant le plasmide pCDNA3.1Halo-Tag.

L'ADN plasmidique est obtenu par purification sur colonnes (QIAGEN). L'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage.

La cassette correspondant à la séquence codante du SnapTag est isolée du pSEM-S1-ST26m par digestion enzymatique ClaI-XhoI (Biolabs) et transférée dans le plasmide pBluescript KS (Stratagene) préalablement digéré par les mêmes enzymes.

La ligation est faite par de la T4 Ligase (Invitrogen). Le produit de ligation est transformée dans des bactéries chimiocompétentes Turbo cells (GenetherapySystem). Les bactéries transformées sont étalées sur un du milieu LB-Agar (Sigma) + 0.1 mg/ml d'ampiciline (Eurogentec) permettant la sélection des bactéries possédant le plasmide pBlescriptKS-ST26m. L'ADN plasmidique est obtenu par purification sur colonnes (QIAGEN). L'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage.

Le plasmide permettant d'obtenir la séquence codante de la protéine de fusion SnapTag - HaloTag est obtenu en transférant la cassette correspondant à la séquence du SnapTag, isolée par digestion du plasmide pBlescriptKS-ST26m par XbaI-KpneI (Biolabs), dans le plasmide pCDNA3.1Halo-Tag préalablement digéré par NheI-KpneI. L'ADN plasmidique correspondant au plasmide pBlescriptKS-ST26m-HaloTag est obtenu par purification sur colonnes (QIAGEN).). L'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage.

Les cellules Cos-7 sont transfectées de façon transitoire avec la construction plasmidique pBlescriptKS-ST26m-HaloTag avec de la lipofectamine 2000 ou par électroporation en plaque 96 puits.

24 h ou 48h après la transfection transitoire, les cellules COS-7 sont incubées pendant 1 heure avec du milieu cellulaire contenant 5 μ M de chaque substrat spécifique des enzymes HaloTag et SnapTag, chacun des substrats étant lié de manière covalente à un membre d'un couple de partenaires de FRET et à un motif lui permettant de traverser la membrane plasmique (fabriqué par exemple selon le schéma des Figures 7 ou 8).

Après 3 lavages en KREBS+0.05 % Tween-20, un signal de FRET est mesuré sur un lecteur du RubyStar (BMG), ce qui montre que la méthode selon l'invention peut être utilisée pour mesurer un signal de FRET généré à l'intérieur de cellules vivantes.

Exemple 10 : Exemple de TR-FRET intracellulaire induit (FRB-FKBP)

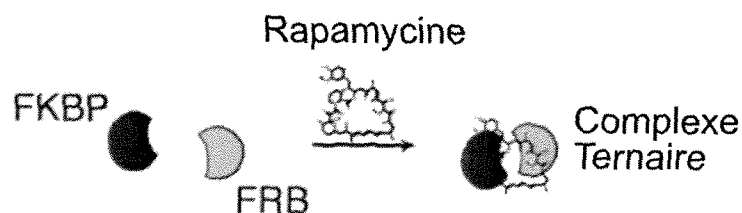
Modèle utilisé :

La méthode selon l'invention est ici appliquée à la mise en évidence de l'interaction des protéines intracellulaires FKBP12 et le domaine FRB de la protéine FRAP lorsque de la rapamycine est ajoutée au milieu de culture.

FKBP12 est une protéine de 12 kDa qui appartient à la famille des immunophilines. La fixation de rapamycine sur FKBP12 rend la protéine cytosoluble en dissociant FKBP de ces partenaires.

La protéine FRAP (ou mTOR) contient le domaine FRB : ce domaine est composé de 99 acides aminés (correspondant à la séquence de mTOR E2015 - Q 2114).

La rapamycine est une molécule isolée d'une bactérie *Streptomyces hygroscopicus* et disponible commercialement. La rapamycine occupe deux poches hydrophobes distinctes, une sur FKBP et une sur FRB, elle lie les deux protéines en même temps.



- Construction pour l'obtention d'une protéine de fusion Halotag-FRB dans un plasmide d'expression cellulaire.

Une PCR sur le plasmide pHT2 (Promega) est réalisée avec les amorces suivantes :

Amorce ERV-Nco-HT-s : 5' gcggatatcgccaccatgggatcc 3'

Amorce HT-PstI-HT-as : 5' acttaattaactgcaggccggccagc 3'

La PCR est faite avec la polymérase Phusion (Finnzyme) à une température d'hybridation de 72 °C.

Le produit de PCR est digéré par les enzymes NcoI-PstI, 1 h à 37 °C, les enzymes sont ensuite inactivées à 80°C pendant 20 min.

Le plasmide pBAD-ST26-FRB fourni par la société Covalys est digéré par NcoI et PstI pour retirer la cassette correspondant au SnapTag (ST26). Le plasmide linéaire pBAD-FRB obtenu est ligué avec le produit de PCR HaloTag décrit plus haut.

La ligation est faite par de la T4 Ligase (Invitrogen). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries chimiocompétentes Turbo cells (GenetherapySystem). Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB-Agar (Sigma) + 0.1 mg/ml d'ampicilline (Eurogentec) permettant la sélection des bactéries possédant le plasmide.

Le plasmide obtenu pBAD-HT-FRB est purifié sur colonne (QIAGEN) et contrôlé par séquençage.

La cassette correspondant à la séquence codante de la protéine de fusion HaloTag (HT)-FRB est amplifiée par PCR à partir de la matrice pBAD-HT-FRB avec les amorces suivantes :

Amorce ERV-Nco-HT-s : 5' gcggatatcgccaccatgggatcc 3'

Amorce pBAD rev : 5' gttctgatttaactctgtatca 3'

La PCR est faite avec la polymérase Phusion (Finnzyme) à une température d'hybridation de 72 °C.

Le produit de PCR est digéré par les enzymes EcoRV-AscI, 1 h à 37 °C, les enzymes sont ensuite inactivées à 65°C pendant 20 min.

Le produit de PCR digéré est transféré dans un plasmide d'expression cellulaire pSEM-XT (covalys) digéré par EcoRV et AscI.

La ligation est faite par de la T4 Ligase (Invitrogen). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries chimiocompétentes Turbo cells

(GenetherapySystem). Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB-Agar (Sigma) + 0.1 mg/ml d'ampiciline (Eurogentec) permettant la sélection des bactéries possédant le plasmide.

L'ADN plasmidique est obtenu par purification sur colonne (QIAGEN).). L'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage.

- Construction pour l'obtention d'une protéine de fusion SNAPTAG-FKBP dans un plasmide d'expression cellulaire.

La cassette correspondant à la séquence codante de la protéine FKBP est isolée du plasmide pBAD-ST-FKBP (Covalys) par digestion PstI-AscI, et transférée dans un plasmide d'expression cellulaire pSEMXT-26 (covalys).

La ligation est faite par de la T4 Ligase (Invitrogen). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries chimiocompétentes Turbo cells (GenetherapySystem). Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB-Agar (Sigma) + 0.1 mg/ml d'ampiciline (Eurogentec) permettant la sélection des bactéries possédant le plasmide.

L'ADN plasmidique est obtenu par purification sur colonnes (QIAGEN).). L'intégrité de la séquence est vérifiée par séquençage.

Les cellules Cos-7 sont transfectées de façon transitoire avec les deux constructions plasmidiques (Halo-Tag-FRB et SNAP-Tag-FKBP) avec de la lipofectamine 2000 ou par électroporation en plaque 96 puits à une concentration cellulaire de 10 000 cellules par puits.

24 h ou 48h après la transfection transitoire les cellules COS-7 sont incubées pendant 1 heure avec du milieu cellulaire contenant 5 μ M de chaque substrat spécifique des enzymes HaloTag et SnapTag, chacun des substrats étant lié de manière covalente à un membre d'un couple de partenaires de FRET et à un motif lui permettant de traverser la membrane plasmique (fabriqué par exemple selon le schéma des Figures 7 et 8).

Après 3 lavages en KREBS+ 0.05 % tween-20, la fluorescence est mesurée sur un lecteur du type RubyStar (BMG) avant et après induction de l'interaction protéique par 100 nM de rapamycine (Calbiochem) : le signal de TR-FRET est significativement plus

élevé après incubation avec la rapamycine.

Cet exemple montre que la méthode selon l'invention permet de mettre en évidence une interaction biologique dans une cellule vivante par à l'aide de la technique de TR-FRET.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection d'interactions entre bio-molécules, de translocation ou de changement de conformation de bio-molécules dans des cellules vivantes, comprenant les étapes suivantes :

- 1) marquer, dans une cellule vivante, une première bio-molécule avec un premier composé fluorescent possédant une durée de vie de fluorescence longue ;
- 2) marquer, dans ladite cellule vivante, au moins une deuxième bio-molécule avec un deuxième composé fluorescent ;
- 3) soumettre les cellules vivantes à une stimulation spécifique adaptée à la réponse biologique à étudier, en présence ou non d'un composé appartenant à une librairie de molécules à tester ;
- 4) soumettre les cellules vivantes à une source lumineuse ayant une longueur d'onde permettant l'excitation dudit premier composé fluorescent à durée de vie longue ;
- 5) mesurer l'intensité de la fluorescence émise par lesdits premier et second composés fluorescents, calculer le rapport entre les intensités de fluorescence dudit premier composé fluorescent et dudit second composé fluorescent, ou mesurer la durée de vie du premier ou du second composé fluorescent ; et
- 6) comparer les signaux mesurés à ceux obtenus avant stimulation des cellules ;

lesdit premier et au moins second composés fluorescents étant partenaires de TR-FRET.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on étudie un changement de conformation d'une bio-molécule et en ce que les composés fluorescents sont couplés à la même bio-molécule

3. Procédé selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le marquage des bio-molécules par les composés fluorescents est effectué à l'aide d'une technique choisi parmi les suivantes : marquage covalent par action d'un enzyme suicide, marquage covalent par épissage protéique, marquage par expression d'une protéine de fusion comprenant la bio-molécule et une protéine fluorescente en tant que composé

fluorescent, marquage non-covalent de haute affinité par l'intermédiaire de partenaires de liaison.

4. Procédé selon les revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le marquage composé fluorescent / bio-molécule est effectué en couplant le composé fluorescent et la bio-molécule, respectivement avec les membres des couples choisis parmi : un substrat de SNAP-Tag / l'enzyme SNAP-Tag, un substrat d'HALO-Tag / l'enzyme HALO-Tag, une partie d'intéine telle que l'intéine de *Ssp DnaE* / la partie d'intéine complémentaire permettant de reconstituer une intéine fonctionnelle, un motif bi-arsenic / la séquence Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, X représentant un acide aminé quelconque, un ion métallique / une séquence poly-histidine, la biotine / la streptavidine, la streptavidine / la biotine, la bungarotoxine / le tag BTX, la cadaverine / la séquence protéique PKPQQFM, l'aziridine / la séquence nucléique TCGA

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'au moins un des composés fluorescents comporte un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le motif permettant au composé fluorescent de franchir la membrane plasmique est choisi parmi les motifs suivants : ester tels que les pivaloyl-oxyméthyle ester, acétoxyméthyle ester, ou les esters glycoliques ; des peptides viraux pris en charge par des transporteurs membranaires tels que la penetratin et ses analogues, le transportan et ses analogues, les groupes polyarginines, les peptoides portant des groupes guanidines ; les dérivés non-hydrolysables à motifs tétraganidinium ; des groupes cholestérol, vitamines E ou des chaînes aliphatiques, telles que les chaînes undécyl ou 1,2-di-O-hexadécyl-glycérol.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la durée de vie du premier composé fluorescent est supérieure à 100 nanosecondes.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le premier composé fluorescent est choisi parmi les chélates ou cryptates de terres rares.

9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le premier composé fluorescent est un cryptate de terre rare comprenant un motif pyridine

10. Procédé selon les revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la terre rare est le terbium ou l'euporium.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce

que le deuxième composé fluorescent est choisi parmi les composés suivants : les protéines fluorescentes telles que la protéine fluorescente verte (GFP) et ses dérivés (notamment CFP, YFP), les protéines fluorescentes extraites de coraux, les phycobiliprotéines, telles que la B-phycoérythrine, la R-phycoérythrine, la C-phycoocyanine, les allophycocyanines, en particulier celles connues sous la dénomination XL665 ou les composés fluorescents organiques ayant des durée de vie inférieure à 100 nanosecondes, telles que les cyanines, les rhodamines, les fluorescéines, les squarènes et les molécules fluorescentes connues sous le nom de BODIPY's (difluorobora-diaza indacenes), les composés connus sous la dénomination AlexaFluor.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le deuxième composé fluorescent est un composé fluorescent organique comportant un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique.

13. Nécessaire de composants (kit of parts), comprenant :

- un premier composé fluorescent et au moins un second composé fluorescent, ces composés étant partenaires de TR-FRET et l'un au moins de ces composés comportant un motif lui permettant de franchir la membrane plasmique ;

- des cellules vivantes comprenant lesdites bio-molécules ;

- des moyens de marquage des bio-molécules par lesdits composés fluorescents;

- des instructions permettant d'étudier des phénomènes d'interactions entre bio-molécules, de translocation ou de changement de conformation de bio-molécules dans les cellules vivantes.

14. Nécessaire de composants selon la revendication 13, caractérisé en ce que les moyens de marquage des bio-molécules par les composés fluorescents consistent à coupler le composé fluorescent et la bio-molécule, respectivement avec les membres des couples choisi parmi : un substrat de SNAP-Tag / l'enzyme SNAP-Tag, un substrat d'HALO-Tag / l'enzyme HALO-Tag, une partie d'intéine telle que l'intéine de Ssp DnaE / la partie d'intéine complémentaire permettant de reconstituer une intéine fonctionnelle, un motif bi-arsenic / la séquence Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, X représentant un acide aminé quelconque, un ion métallique / une séquence poly-histidine, la biotine / la streptavidine, la streptavidine / la biotine, la bungarotoxine / le tag BTX, la cadaverine / la séquence protéique PKPQQFM, l'aziridine / la séquence nucléique TCGA, l'enzyme

dihydrofolate réductase / triméthoprime.

15. Nécessaire de composants selon la revendication 13, caractérisé en ce que le motif permettant à au moins un des composés fluorescents de franchir la membrane plasmique est choisi parmi les suivants : ester tels que les pivaloyl-oxyméthyle ester, acétoxyméthyle ester, ou les esters glycoliques ; des peptides viraux pris en charge par des transporteurs membranaires tels que la penetratine et ses analogues, le transportan et ses analogues, les groupes polyarginines, les peptoïdes portant des groupes guanidines ; les dérivés non-hydrolysables à motifs tétraguadininium des groupes cholestérol, vitamines E ou des chaînes aliphatiques telles que les chaînes undécyl ou 1,2-di-O-hexadécyl-glycérol.

16. Nécessaire de composants selon la revendication 13, caractérisé en ce que les cellules sont génétiquement modifiées de manière à exprimer les bio-molécules à étudier, ou des protéines de fusion comprenant les molécules à étudier.

17. Nécessaire de composants selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend un composé fluorescent à durée de vie longue et au moins un autre composé fluorescent choisi parmi les suivants : les protéines fluorescentes, telles que la protéine fluorescente verte (GFP) et ses dérivés (notamment CFP, YFP), ou des composés fluorescents ayant des durée de vie inférieure à 100 nanosecondes, tels que les cyanines, les rhodamines, les fluorescéines, les squarènes et les molécules fluorescentes connues sous le nom de BODIPY's (difluorobora-diaza indacenes), les composés connus sous la dénomination AlexaFluor, les protéines fluorescentes extraites de coraux, les phycobiliprotéines, telles que la B-phycoérythrine, la R-phycoérythrine, la C-phycocyanine, les allophycocyanines, en particulier celles connues sous la dénomination XL665.

18. Nécessaire selon la revendication 17, caractérisé en ce que le composé fluorescent à durée de vie longue à une durée de vie supérieure à 100 ns.

19. Nécessaire selon la revendication 18, caractérisé en ce que le composé fluorescent à durée de vie longue est un chélate de terre rare ou un cryptate de terre rare.

20. Nécessaire selon la revendication 18, caractérisé en ce que le composé fluorescent à durée de vie longue est un chélate de terre rare ou un cryptate de terbium ou d'europium.

1/9

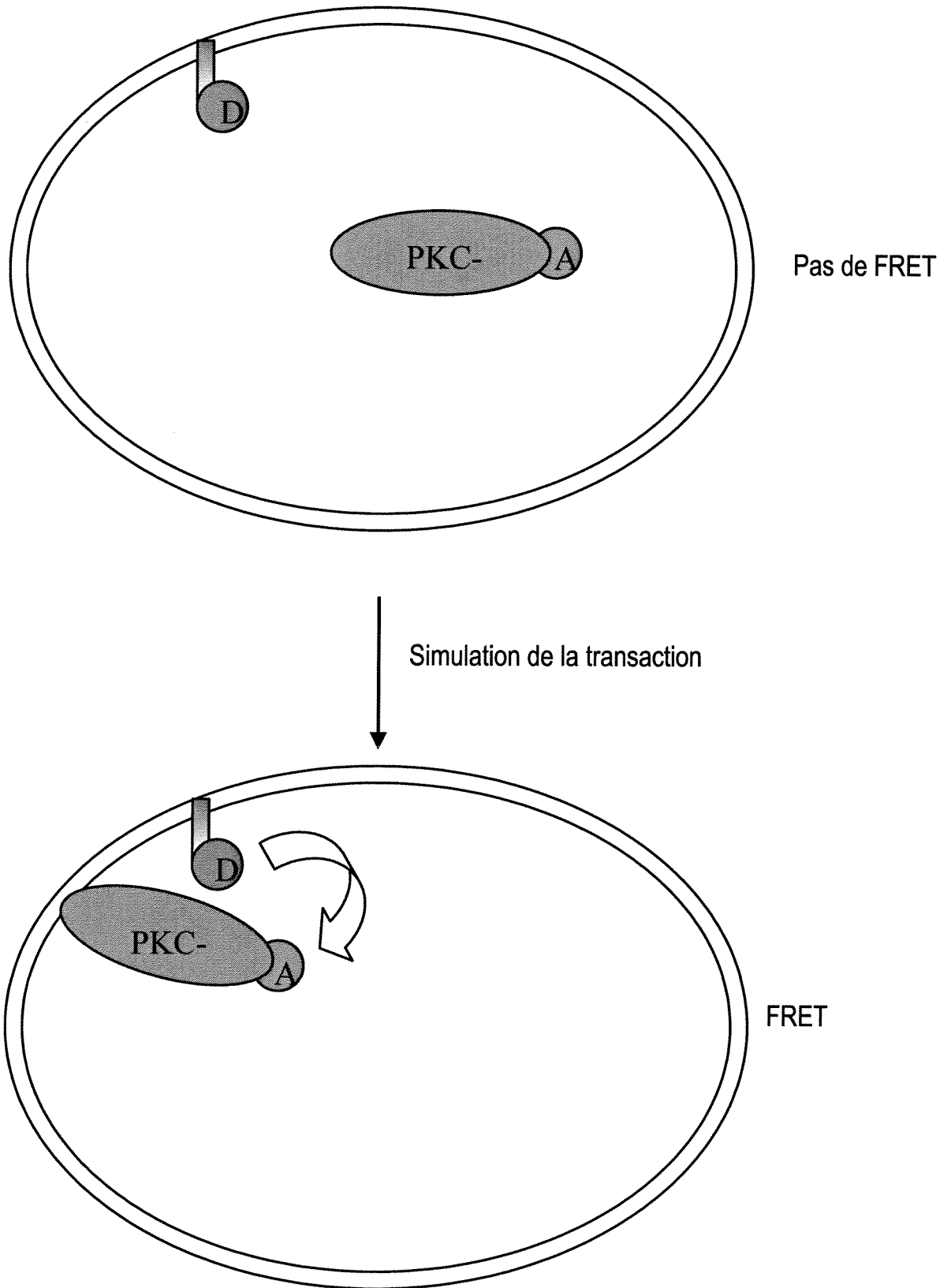


FIG.1

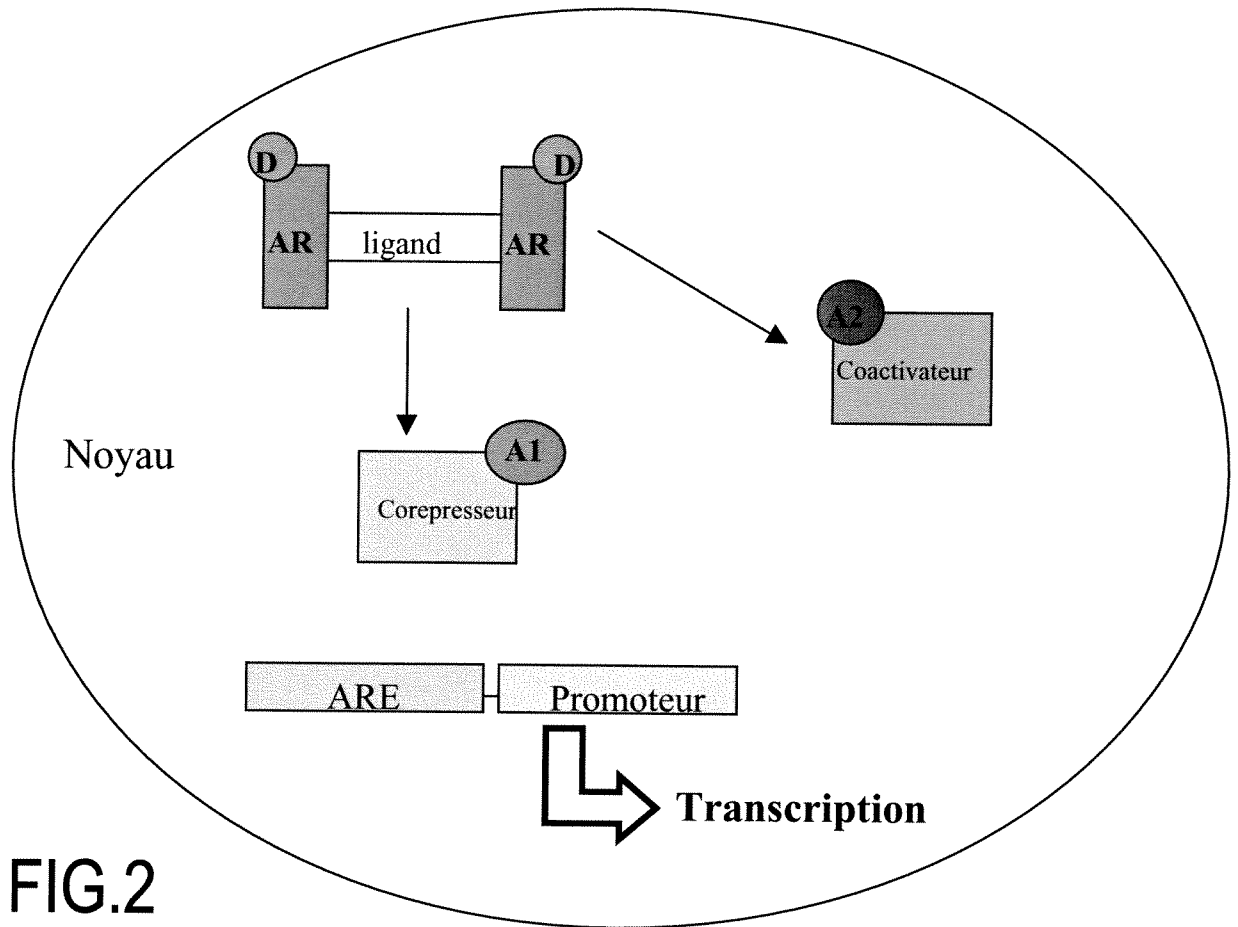


FIG.2

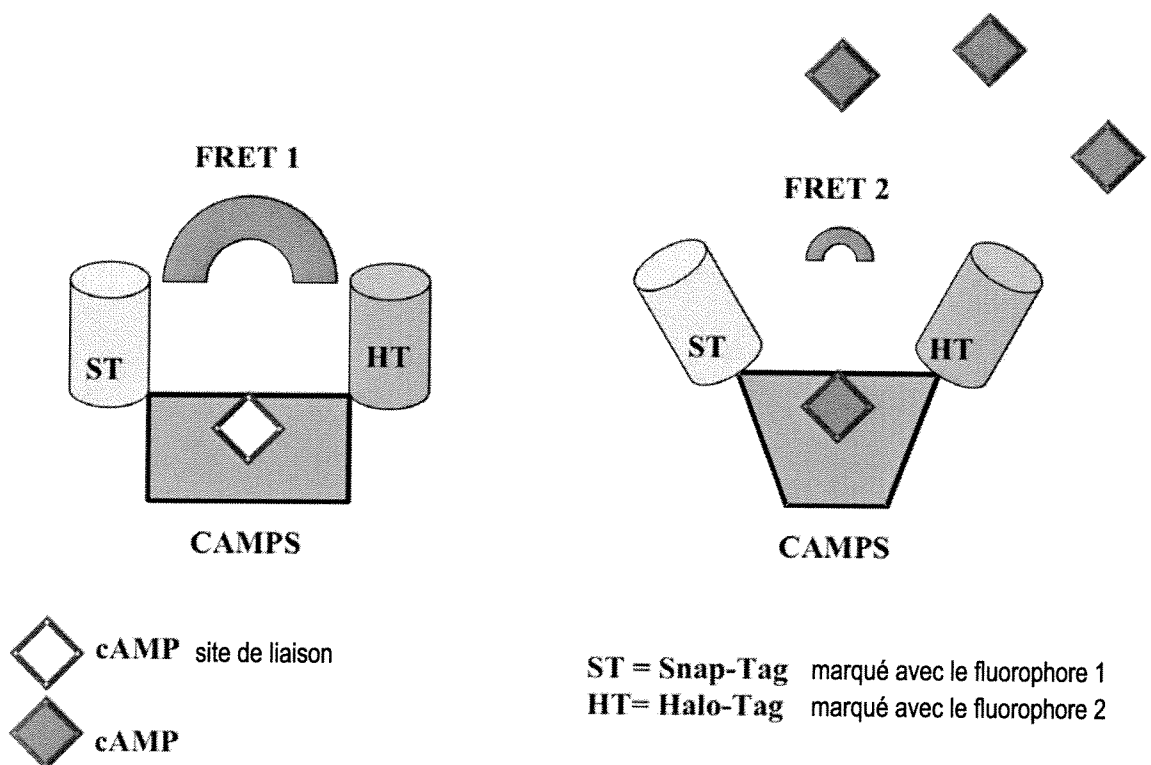


FIG.3

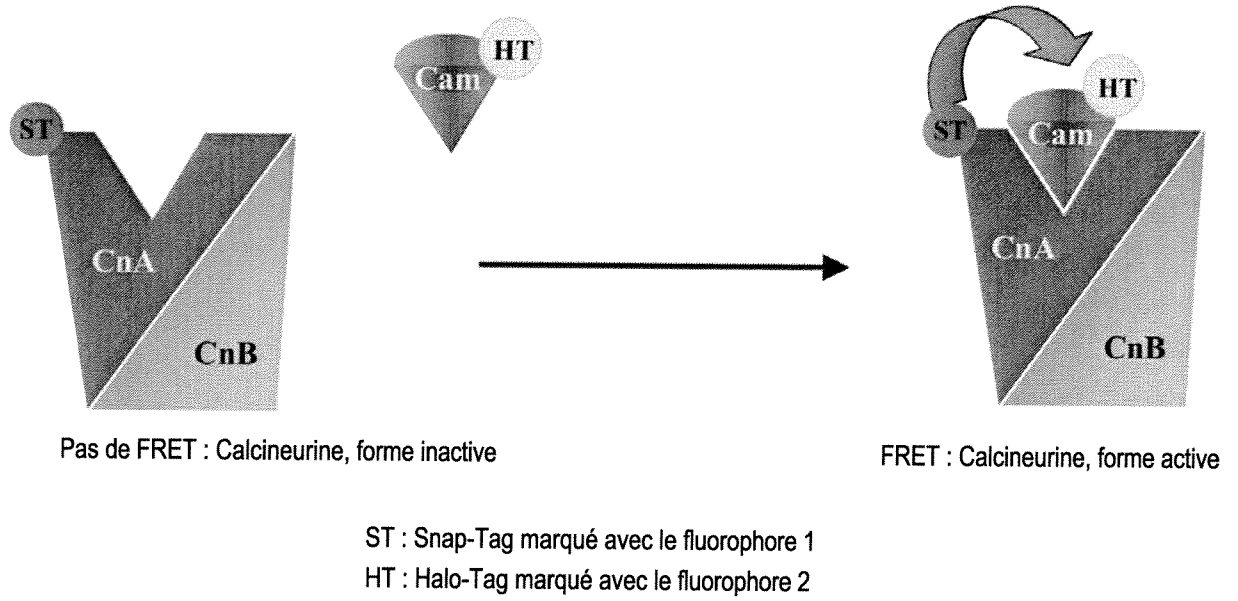


FIG.4

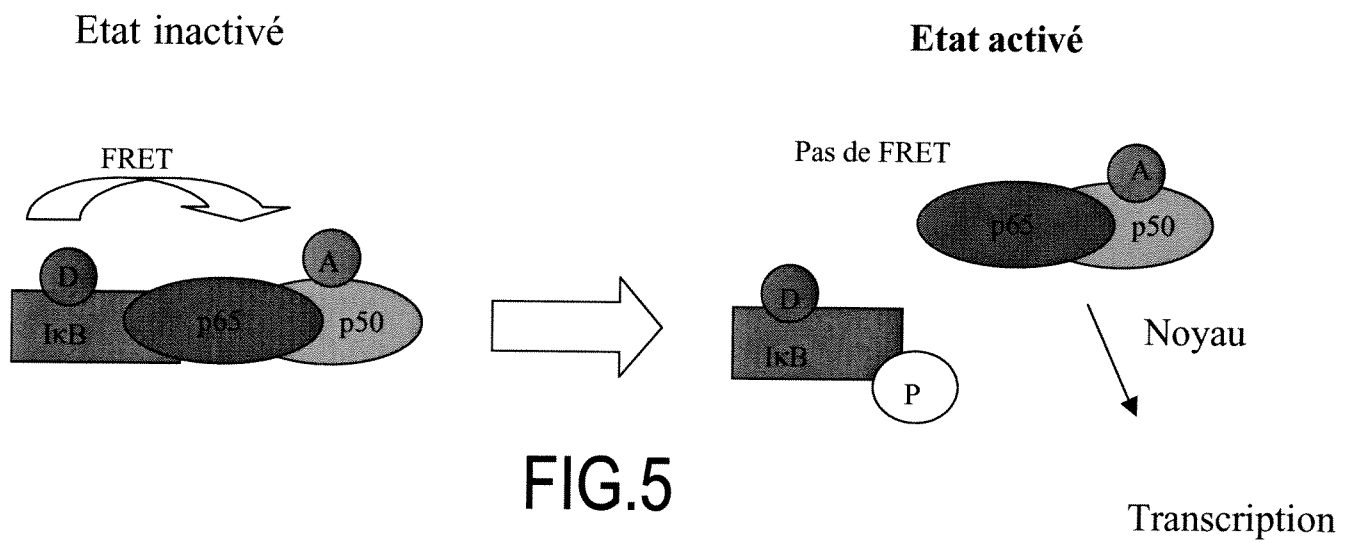


FIG.5

4/9

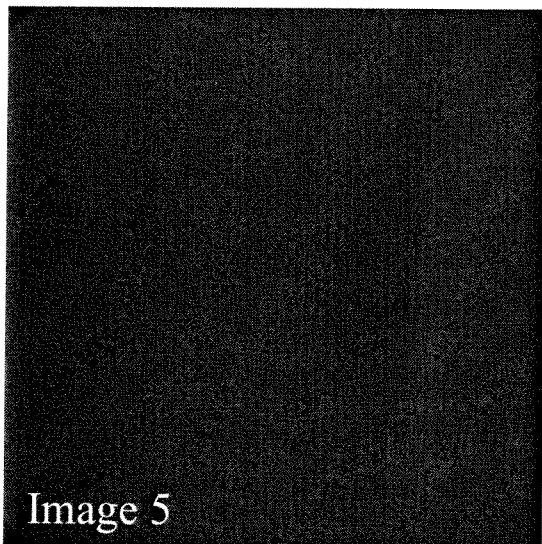
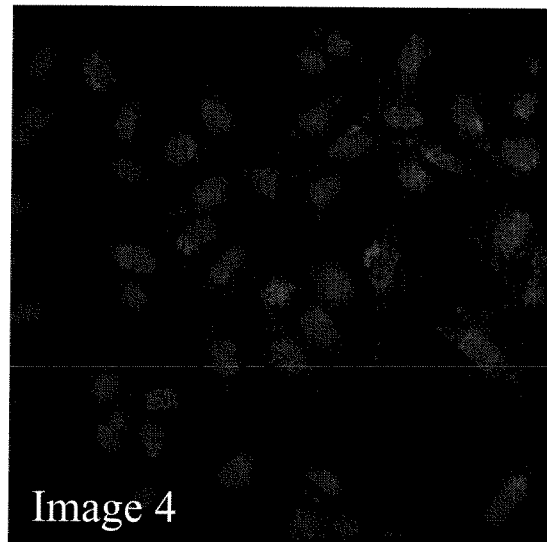
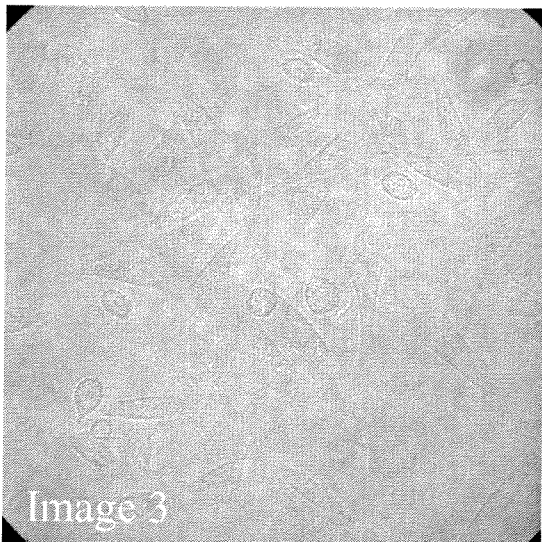
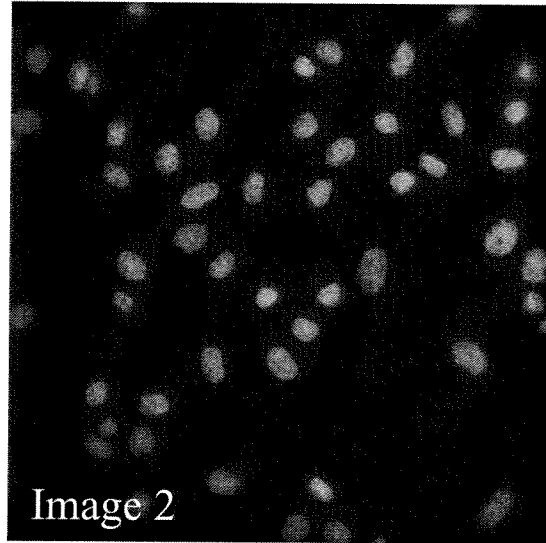
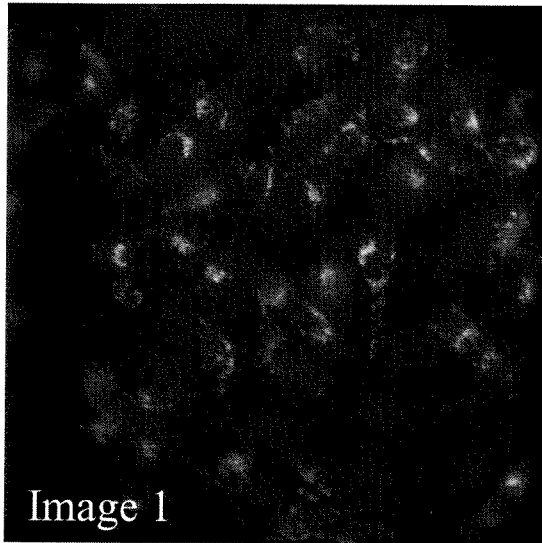


Image 1: acquisition en temps résolu
Image 2: révélation Hoechst 33342
Image 3: lumière transmise
Image 4: superposition des images 1 et 2
Image 5: contrôle négatif en temps résolu

FIG.6

5/9

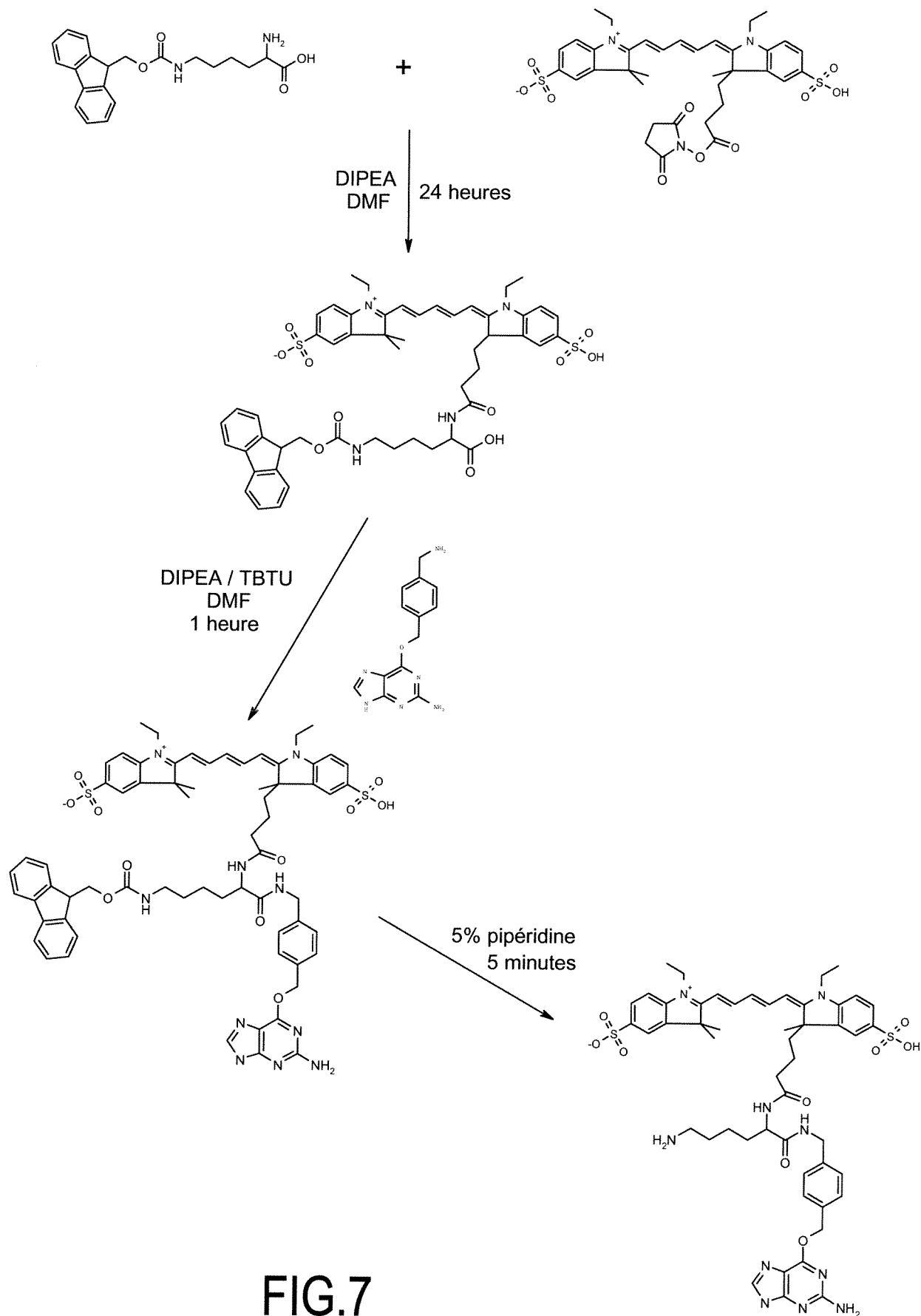


FIG.7
DY647 + BG + NH2

6/9

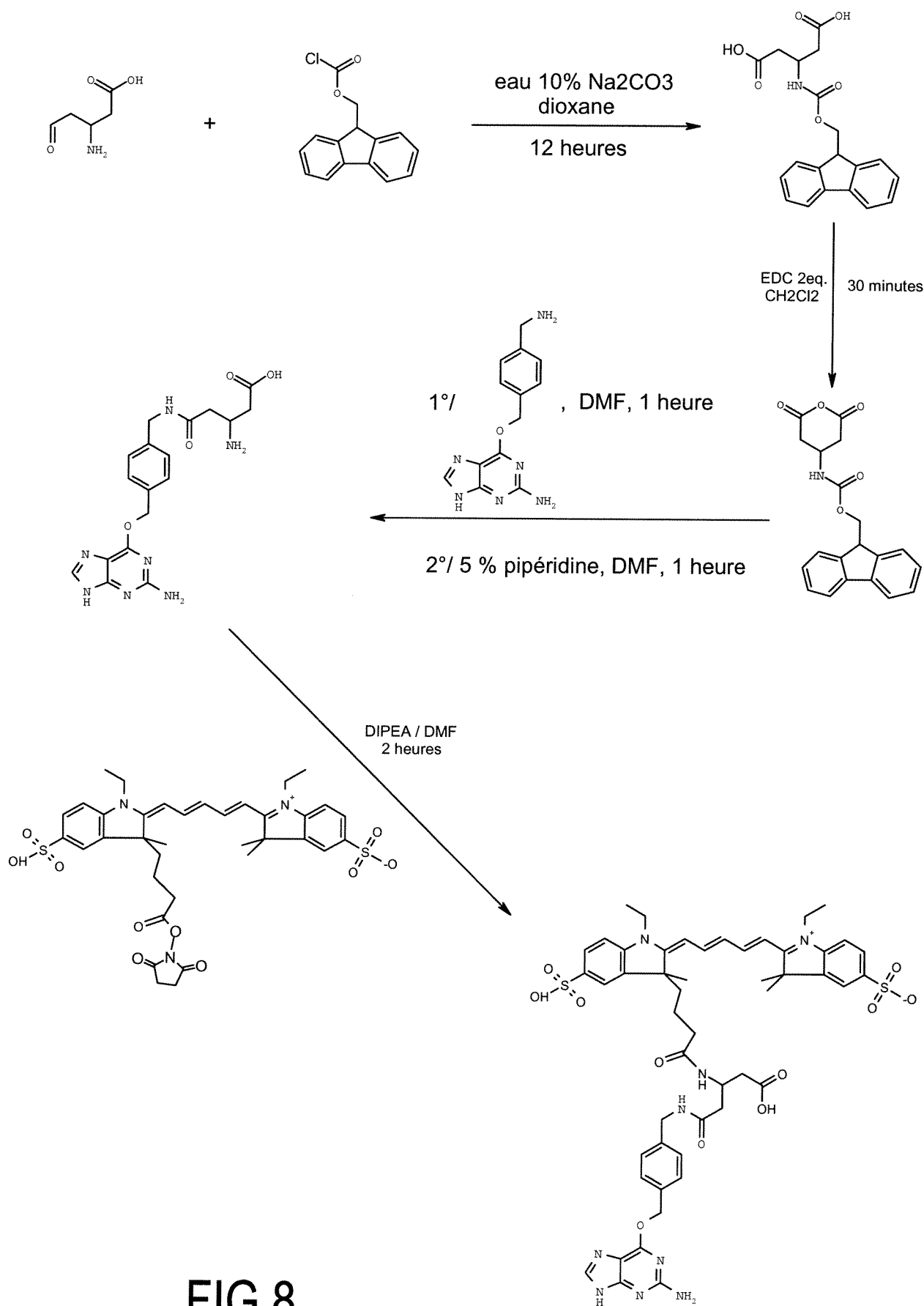


FIG.8

DY647 + BG + COOH

7/9

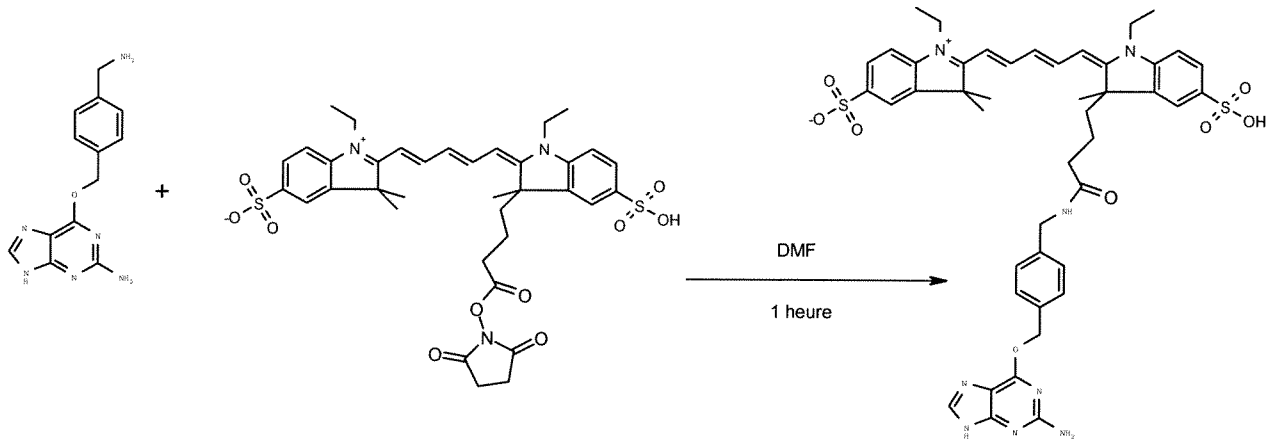
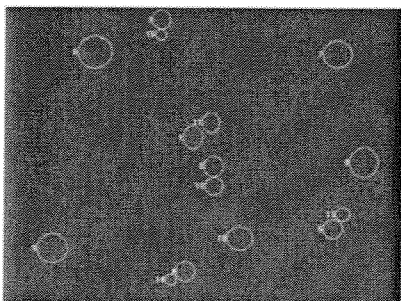


FIG.9



Cellules vivantes

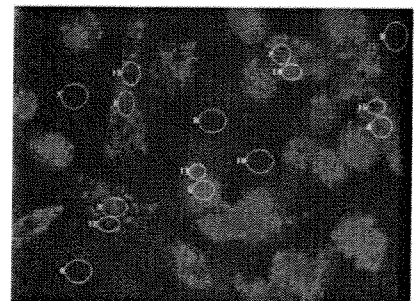
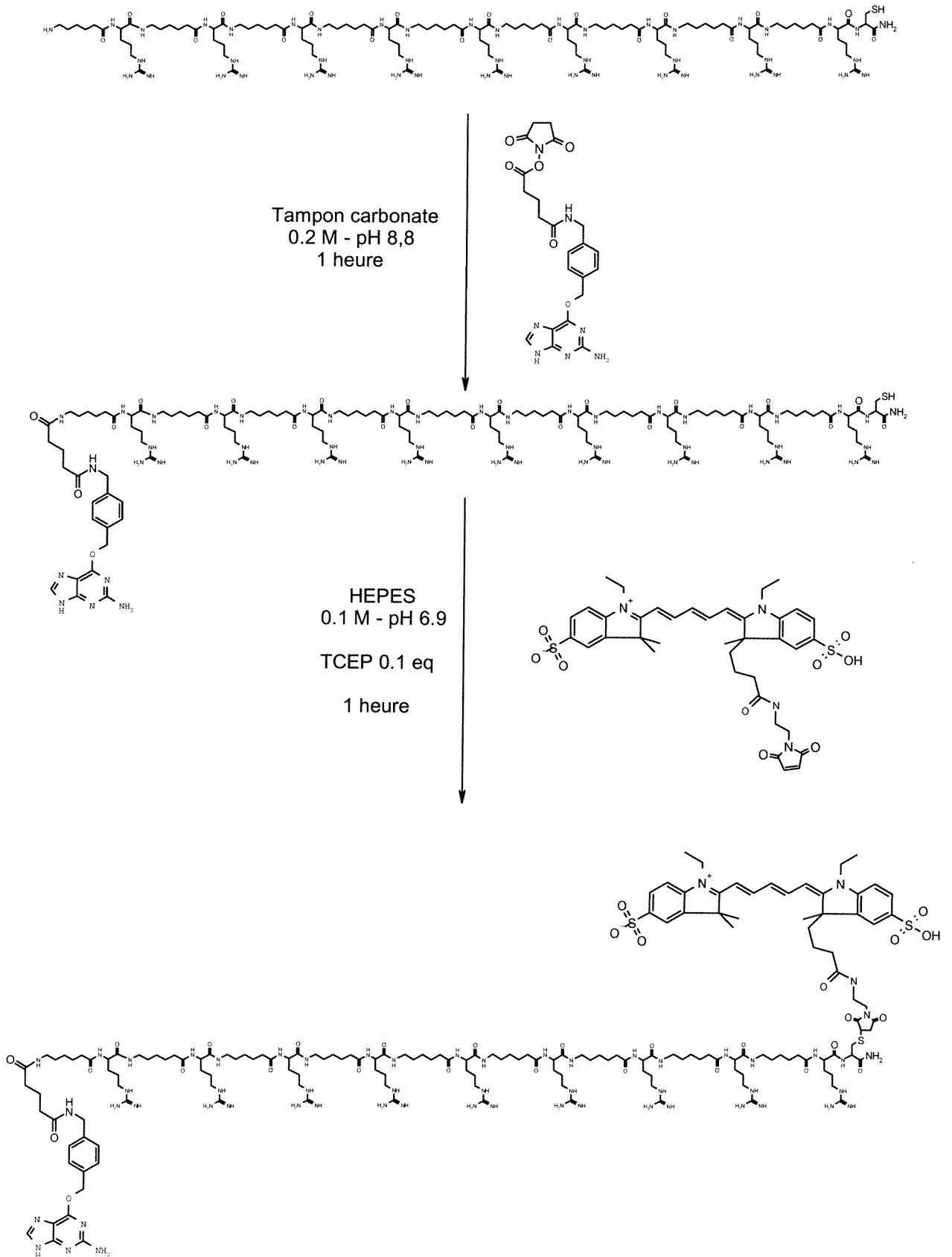


FIG.11



9/9

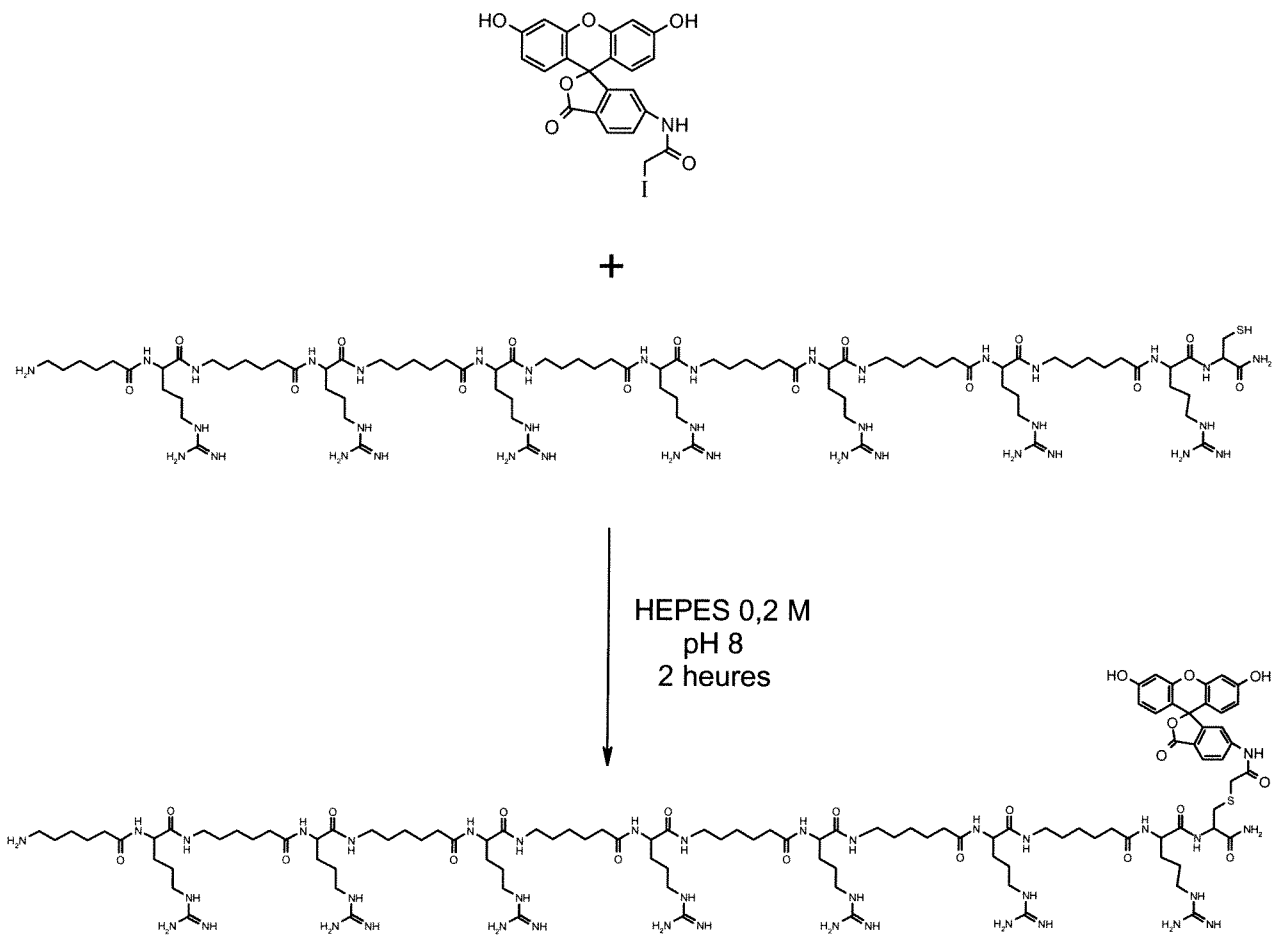


FIG.12

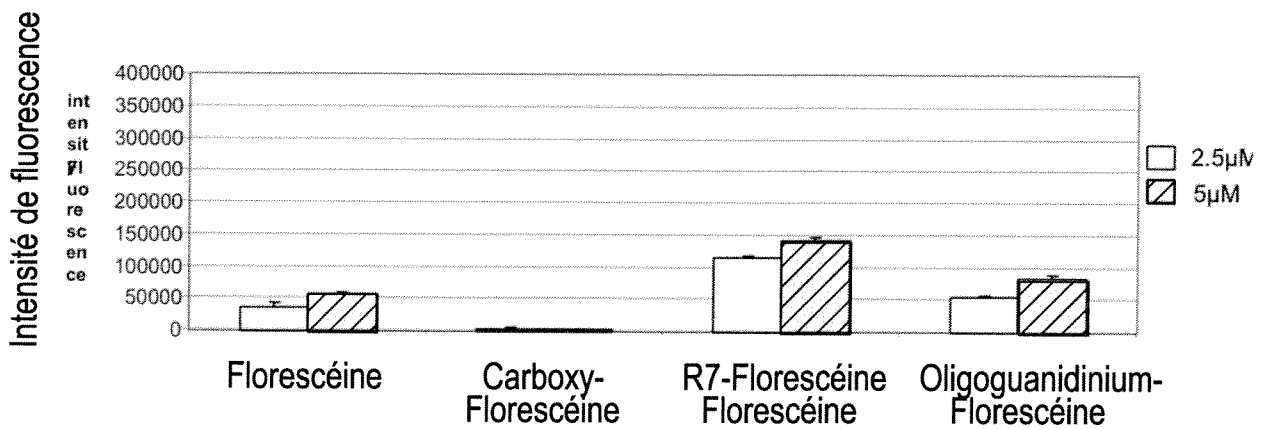


FIG.13