



Office de la propriété
intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada
www.opic.gc.ca

Canadian
Intellectual Property
Office

An Agency of
Industry Canada
www.cipo.gc.ca

(11) (C) **1,341,448**

(21) 599,327

(22) 1989/05/10

(45) 2003/11/25

(52) 195-1.2
RENOI 195-1.22
195-1.35

(51) Int.Cl. ⁷ C12N 15/66; C12Q 1/68; G01N 33/566

(19) (CA) **BREVET CANADIEN** (12)

(54) Vecteur modifié par une séquence codant pour une séquence d'acides aminés contenue dans une protéine de mammifère ayant une activité biologique de récepteur membranaire liant une protéine G

(72) MARULLO, STEFANO, FRANCE
DELAVIER, COLETTE, FRANCE
EMORINE, LAURENT, FRANCE
STROBERG, DONNY, FRANCE

(73) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, FRANCE

(57) 15 Revendications

599,327

PRÉCIS

L'invention concerne un vecteur répliquable dans des cultures d'organismes unicellulaires, ce vecteur contenant un gène codant pour une protéine eucaryote, ayant une activité biologique de récepteur membranaire et interagissant avec une protéine de régulation -dite protéine G- apte à fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP). L'invention concerne aussi les organismes cellulaires transformés par les vecteurs ci-dessus. Elle vise également des procédés de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un récepteur et un procédé pour étudier l'affinité d'un récepteur vis-à-vis d'un ligand ainsi qu'un kit pour détecter l'affinité éventuelle d'un ligand vis-à-vis d'un récepteur.

VECTEUR MODIFIÉ PAR UNE SÉQUENCE CODANT POUR UNE SÉQUENCE
D'ACIDES AMINÉS CONTENUE DANS UNE PROTÉINE DE MAMMIFÈRE AYANT
UNE ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DE RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE LIANT UNE
PROTÉINE G

5

L'invention concerne un vecteur répliquable dans des cultures d'organismes unicellulaires, ce vecteur contenant un gène codant pour une protéine eucaryote, ayant une activité biologique de récepteur membranaire et interagissant avec une protéine de régulation -dite protéine G- apte à fixer des molécules de guanosine triphosphate (GTP).

15

L'invention est également relative à des organismes unicellulaires transformés par des gènes codant pour ces récepteurs membranaires et portant à leur surface des séquences peptidiques reconnues par des ligands spécifiques desdits récepteurs membranaires.

20

L'invention concerne aussi des troussees (ou kits) pour l'identification de protéines de mammifères ayant des caractéristiques permettant de vérifier qu'ils appartiennent à une famille de récepteurs membranaires de mammifères ou, à l'inverse, d'étudier le degré d'affinité de certaines substances pour des récepteurs membranaires déterminés.

25

D'une façon générale, les protéines G sont des protéines ayant la capacité de s'interposer structuralement et fonctionnellement entre des récepteurs et des enzymes catalysant la production de médiateurs intracellulaires (tels que l'adénylate cyclase, la guanylate cyclase, les phospholipases, les kinases) ou entre des récepteurs et des canaux ioniques dont l'ouverture contrôlée entraîne un flux d'ions (tels que les ions

35

calcium, potassium, sodium, hydrogène) dans la cellule.

5 Ces protéines ont des fonctions de transduction et de couplage et sont caractérisées par une structure monomère composée de trois sous-unités protéiques alpha, bêta, gamma. On peut distinguer différentes protéines G à partir des variations observées dans leur sous-unité alpha ou parfois dans leur sous-unité bêta. Ces protéines G ont été décrites en détail dans l'article de Allen M. Spiegel(21).

10 Des récepteurs membranaires de cellules de mammifères normalement couplés à une protéine G, ont été identifiés par clonage, complétés pour certains d'entre eux par l'analyse de leur séquence. Ces récepteurs comportent des régions exposées à la surface des cellules hôtes, ayant des affinités spécifiques respectives pour
15 une grande variété de ligands, hormones, neurotransmetteurs et autres stimulants sensoriels capables de transmettre des signaux à l'intérieur desdites cellules, via les récepteurs correspondants et les protéines G.

20 Des récepteurs intéressants dans le cadre de l'invention sont notamment les récepteurs suivants :
- les récepteurs β adrénergiques : (récepteur aviaire $\beta 1$, de mammifère $\beta 1$ et $\beta 2$), récepteur du Glucagon, de l'hormone adrénocorticotrope, de l'hormone parathyroïde
25 (PTH : abréviation anglaise de "Para Thyroid Hormone"), de l'hormone thyroïdienne, du facteur libérant de l'hormone de croissance, de la prostaglandine E, les récepteurs D1 dopaminergique, du peptide vasoactif intestinal, les récepteurs muscariniques M1 à M6, le
30 récepteur de la sérotonine S1, S2, le récepteur D2 dopaminergique, du neuropeptide substance K, de la vasopressine, de la somatostatine, de la thyrostimuline, de la bombésine, de la cholécystokinine (CCK), les récepteurs de la lumière, du peptide Met-Leu-Phe chem-

tactique, les récepteurs α adrénergiques ($\alpha 1, \alpha 2$), le récepteur H1 histaminique, le récepteur des opioïdes (enkephalines, endorphines), du neuropeptide substance P, de l'angiotensine II, de la prostaglandine, du
5 facteur libérant l'hormone corticotrope, de la bradykinine, de la sécrétine, le récepteur olfactif.

Une famille préférée de récepteurs selon l'invention, qui présentent des caractéristiques génétiques et moléculaires qui leur sont essentiellement
10 communes, comprend des récepteurs $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\alpha 1$ et $\alpha 2$ -adrénergiques (1)(2)(3)(4), des récepteurs muscariniques appartenant aux sous-types M1 à M4 (5)(6) et le récepteur du neuropeptide connu sous la désignation "substance K"(7). Ces récepteurs paraissent posséder une
15 organisation structurale commune au sein de la membrane plasmique, normalement caractérisée par sept segments transmembranaires hydrophobes entre lesquels s'intercalent des boucles extra- et intra-cellulaires, par une région aminoterminal extracellulaire et par une région
20 carboxyterminale cytoplasmique.

Plusieurs gènes codant respectivement pour certains de ces récepteurs ont été rendus capables, après leur introduction dans des cultures de cellules de mammifères appartenant à des espèces étrangères de s'y
25 exprimer. Les opérations de transformations nécessaires à l'expression de ces gènes dans des cellules de mammifères appartenant à des espèces étrangères sont assez complexes et ne peuvent être aisément généralisées à l'expression d'autres récepteurs.

30 L'invention a pour but de fournir des procédés et moyens rendant aisée l'identification et l'étude de nouveaux récepteurs membranaires présentant des caractéristiques structurales communes avec les récepteurs membranaires du type sus-indiqué. A l'inverse elle a

pour but l'étude aisée du niveau d'affinité éventuel de molécules susceptibles de se comporter comme des ligands à l'égard de ces récepteurs membranaires.

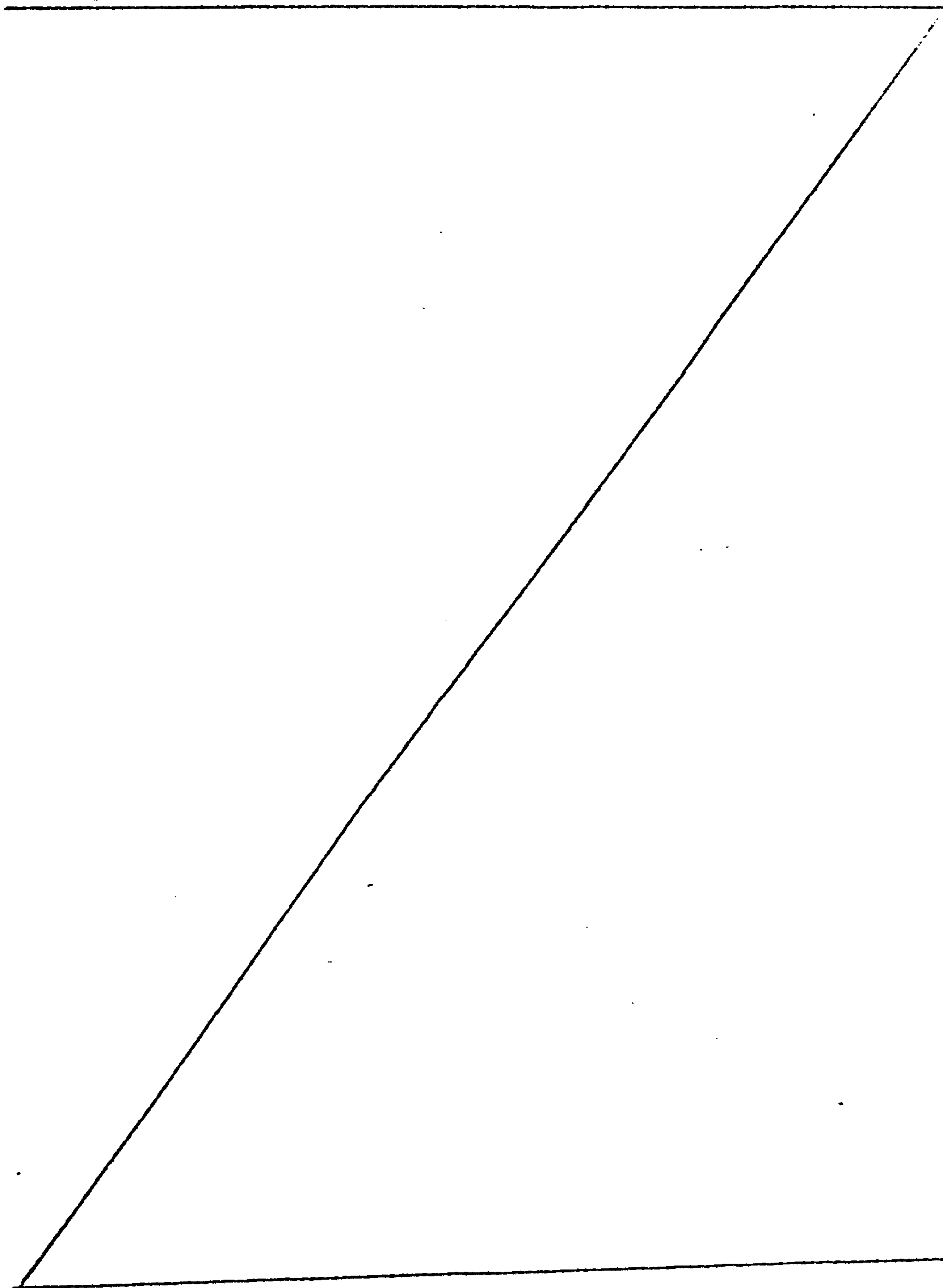
En particulier, l'invention concerne un vecteur répliquable dans une culture d'un hôte unicellulaire contenant un insérat de nucléotides codant pour une séquence d'acides aminés contenue dans une protéine de mammifère et ayant une activité biologique de récepteur membranaire, ce vecteur étant caractérisé en ce que l'insérat est placé sous le contrôle d'une séquence, incluse dans ce vecteur, autorisant l'expression de cet insérat dans ledit hôte cellulaire, et comportant notamment un promoteur reconnu par les polymérases de cet hôte unicellulaire, et en ce que cet insérat code pour une séquence d'acides aminés contenue dans une protéine présentant des éléments de structure en commun avec les récepteurs membranaires susdits, notamment les récepteurs α - ou β -adrénergiques, les récepteurs muscariniques, les récepteurs neuropeptidiques, en particulier la "substance K".

L'invention résulte de la découverte que le fait de placer une séquence de nucléotides codant pour un récepteur membranaire de mammifère sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte unicellulaire dans des conditions permettant l'expression de cette séquence de nucléotides au sein de l'organisme unicellulaire permet également, lorsque se manifeste cette expression, le transport du produit d'expression dans les membranes de l'hôte unicellulaire, et que cette expression s'accompagne également de l'exposition, également à l'extérieur de ces hôtes unicellulaires, des sites caractéristiques des récepteurs membranaires qui affleurent à la surface des cellules de mammifères d'origine, et ce sous une configuration

spatiale

conservée à l'échelle moléculaire, de sorte que ces sites peuvent être reconnus par les mêmes ligands.

Par "hôte unicellulaire" on entend tout organisme susceptible d'être maintenu en culture en



l'absence de différenciation cellulaire. L'organisme unicellulaire de choix est constitué par Escherichia Coli. Mais d'autres microorganismes peuvent être utilisés tout aussi aisément, naturellement sous réserve que l'on connaisse pour chacun d'entre eux des vecteurs
 5 notamment plasmidiques susceptibles de s'y répliquer et des séquences de nucléotides insérables dans ces vecteurs et capables, lorsqu'elles sont suivies dans ces vecteurs par un insérat codant pour un polypeptide ayant
 10 les propriétés d'un récepteur membranaire dans les conditions sus-indiquées, d'assurer l'expression de cet insérat dans les organismes choisis et leur transport dans les membranes de ces hôtes unicellulaires.

S'agissant de réaliser l'expression dans
 15 E.coli, la séquence dirigeant l'expression de l'insérat peut comporter, par exemple, les éléments de régulation, notamment le promoteur de l'opéron lactose ou de l'opéron tryptophane.

D'autres organismes unicellulaires susceptibles d'être mis en oeuvre et par conséquent d'autres
 20 vecteurs, eux-mêmes modifiables par une séquence susceptible de diriger l'expression d'un récepteur membranaire ou analogue dans ces organismes unicellulaires, sont indiqués dans le tableau ci-après :

25	Organisme unicellulaire	Type vecteur	Région promotrice

	S.Cerevisiae	plasmide 2 μ	alcool
30			deshydrogénase I (ADH.I)
	S.Cerevisiae	plasmide PBM 258	promoteur du gène galactokinase (GAL I)

Les organismes sus-indiqués et les vecteurs modifiés correspondants se prêtent avec avantage à l'expression de séquences génétiques codant pour des molécules ayant des caractéristiques de structure en commun avec des récepteurs membranaires déjà connus de mammifères et à leur transport à la membrane de ces hôtes unicellulaires dans les conditions sus-indiquées.

A titre d'exemples de récepteurs susceptibles d'être aussi placés et exprimés dans des organismes unicellulaires, notamment E.coli, on mentionnera :

- les différents récepteurs β -adrénergiques et muscariniques décrits dans le chapitre intitulé "the β -adrenergic receptors and G-proteins" (récepteurs β -adrénergiques et G-protéines) de A.D.Strosberg, dans l'ouvrage édité sous la direction du même auteur sous le titre "The Molecular Biology of receptors - Techniques and Applications of Receptor Research" (La Biologie Moléculaire des récepteurs-Techniques et Applications de la recherche de récepteurs) et publié par Ellis Horwood Ltd. Chichester - Grande Bretagne (VCH)
- ou encore les récepteurs décrits dans les publications de Brian K.Kobilka et al, Nature, Vol. 329, 75-79 du 3 Septembre 1987 ou de L.J.Emorine et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, p. 6995-6999, Octobre 1987.

L'invention permet non seulement l'étude des récepteurs membranaires de mammifères qui ont été indiqués, mais aussi de ceux des récepteurs ou polypeptides ayant des éléments de structures semblables, qui peuvent être obtenus ou purifiés à partir de techniques classiques, par exemple

- soit par des cADNs obtenus par transcription reverse d'ARN messagers et séquencés, par exemple selon les techniques décrites par Dixon.R.A.F. et al (1986) Nature, 321, 75, Dixon,R.A.F. et al (1987)Nature, 326, 73, Yarden, Y. et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 6795-6799,

- soit en ayant recours à des oligonucléotides utilisés comme sondes d'hybridation, permettant l'isolement de polynucléotides codant pour des récepteurs du gène en question selon des techniques connues, comprenant des réactions d'hybridation sélective.

5

Lesdites sondes consistent par exemple en des oligonucléotides-sondes dérivés de fragments d'ADN de régions à fortes homologues entre les différents récepteurs.

10

Des sondes utilisables pour isoler des séquences de nucléotides codant pour des récepteurs membranaires peuvent aussi, par exemple, consister en des fragments conservés, obtenus à partir de séquences nucléotidiques codant pour l'une des sept séquences peptidiques transmembranaires hydrophobes représentées aux pages 148-149 de l'ouvrage déjà cité et édité sous la direction de A.D.Strosberg. Ces différentes séquences peptidiques respectivement visées par les chiffres romains de I à VII, sensiblement analogues entre-elles sont issues respectivement de récepteurs β 2-adrénér-
giques de hamster, de récepteurs β -adrénér-
giques de l'homme, de récepteurs β -adrénér-
giques de la dinde, de récepteurs muscariniques de l'acétyl choline de cerveau de porc et d'opsine de bovin.

15

20

25

Dans le cas de l'opsine de bovin, on aura recours, pour préparer une des sondes précédentes, à l'ADNc correspondant à l'ARN génomique du récepteur.

30

A titre d'exemple, les sondes suivantes pourront être mises en oeuvre pour isoler des séquences nucléotidiques codant pour des récepteurs membranaires.

CTTGGTCAGCTTGGCCTGTGCTGATCTGGTCATG (segment transmembranaire II)

GCTTTCATGGTCAGCTGGCTGCCCTAC (segment transmembranaire VI)

35

On peut aussi mettre en oeuvre des ensembles de sondes généralement représentables par les formules suivantes :

- ensembles transmembranaires II :

5 5'X₁X₂TX₃X₄TX₅X₆X₇CX₈TGGCX₉X₁₀X₁₁X₁₂GCTGAX₁₃CTX₁₄X₁₅
TX₁₆ATG3'

dans laquelle X₁ à X₁₆ ont indépendamment les uns des autres, les significations suivantes :

X₁ est C ou T
10 X₂ est T ou A
X₃ est G ou C
X₄ est G ou T
X₅ est C ou G
X₆ est A ou T
15 X₇ est G ou C
X₈ est T ou C
X₉ est C ou G
X₁₀ est T ou G
X₁₁ est G ou T
20 X₁₂ est T ou G
X₁₃ est T ou C
X₁₄ est G ou C
X₁₅ est G ou T
X₁₆ est C ou G

25 et ensembles transmembranaires VI :

5'GCY₁TTCATY₂Y₃TY₄Y₅Y₆CTGGY₇TY₈CCY₉TY₁₀C3'

dans laquelle Y₁ à Y₁₀ représentent indépendamment les uns des autres :

Y₁ est T ou G
30 Y₂ est G ou C
Y₃ est G ou C
Y₄ est C ou G
Y₅ est A ou T
Y₆ est G ou C
35 Y₇ est C ou G

Y_8 est G ou C

Y_9 est C ou G

Y_{10} est A ou T

Pour isoler des séquences nucléotidiques présumées coder pour un récepteur membranaire, on utilisera de préférence deux ou plusieurs séquences sondes telles que définies ci-dessus, choisies pour leur appartenance à des régions différentes des séquences nucléotidiques présentant une communauté de séquence dans la partie correspondant aux sept segments transmembranaires décrits plus haut. En particulier, on mettra en oeuvre des sondes du type de celles décrites plus haut avec leurs séquences complémentaires respectives.

On pourra également avoir recours à des ensembles des ces sondes.

On apprécie que le procédé selon l'invention permet alors, pour chaque récepteur membranaire exprimé à la surface des organismes unicellulaires, notamment bactériens, de mesurer les degrés d'affinité de différentes molécules présumées se comporter comme ligands vis-à-vis de ces récepteurs. Ces ligands peuvent d'ailleurs être utilisés également pour repérer au sein de colonies diverses transformées un grand nombre de fragments d'acide nucléique d'origines diverses (expérience dite de "shot gun") parmi lesquels des fragments codant pour ces polypeptides de mammifères. Seront alors détectées celles des colonies qui, en raison de l'expression d'une séquence codant pour le récepteur membranaire de mammifère, forment une liaison avec le ligand correspondant.

A l'inverse, l'invention permet aussi l'étude de l'affinité de diverses molécules possibles à l'égard d'un récepteur membranaire déterminé consistant dans le produit d'expression d'un insérat correspondant inséré dans un vecteur modifié dans les conditions sus-définies

et incorporé à un hôte cellulaire dans lequel ce vecteur est répliquable.

De même l'invention permet de comparer les affinités réciproques d'un récepteur déterminé avec
5 différentes molécules ayant des motifs structuraux en commun avec des récepteurs différents membranaires de mammifères, d'où la possibilité de classer lesdits récepteurs par ordre d'affinité. Tout ligand approprié peut être mis en oeuvre dans ces essais comparatifs. On
10 mentionnera à titre d'exemple de ligands des pindolols, des iodocyano-pindolols, des propranolols, des alprenolols, etc...On peut encore se référer à l'ouvrage édité sous la direction de A.D. Strosberg, dans lequel sont identifiés de nombreux autres agonistes, ou an-
15 tagonistes de récepteurs membranaires répondant aux définitions de l'invention.

Dans l'une de ses applications préférées l'invention concerne donc des cultures cellulaires formées de cellules unicellulaires, notamment de
20 bactéries, contenant des vecteurs répliquables au sein de ces organismes, ces vecteurs répondant aux conditions indiquées plus haut et contenant un insérat codant pour un récepteur membranaire de mammifères répondant aux définitions sus-indiquées, l'expression de ces insérats
25 étant inductible ou ayant fait l'objet d'une induction entraînant le transport à la membrane des récepteurs membranaires correspondants, selon la nature du promoteur utilisé.

Dans un mode de mise en oeuvre préféré de
30 l'invention, le vecteur modifié est caractérisé en ce que l'insérat code pour une séquence d'acides aminés contenue dans un récepteur de mammifère du genre sus-indiqué, comportant dans sa structure des segments transmembranaires hydrophobes intercalés dans des

boucles extra et intra-cellulaires, un segment intra-cellulaire carboxy-terminal, et un segment aminoterminal extracellulaire et des sites de liaisons constitués par des régions hydrophiles formées dans la membrane.

5 Pour la réalisation du vecteur selon l'invention, on mettra en oeuvre de manière avantageuse un promoteur inductible. Un tel promoteur est régulable et n'est fonctionnel qu'après induction par une molécule
10 biochimique ou par un traitement physique (traitement par la température, les rayons ultra violets...). L'utilisation d'un tel promoteur inductible permet donc de faire exprimer la séquence nucléotidique contenue dans le vecteur d'expression modifié, dans des conditions
15 préalablement déterminées par l'opérateur, seulement au moment de l'emploi. De cette façon on évite la dégradation des cellules de la culture hôte transformée par le vecteur modifié, chaque fois que le récepteur étranger devant être exprimé dans la cellule et transporté dans la membrane présente un certain niveau de
20 toxicité pour cette culture.

Suivant un autre mode de réalisation du vecteur selon l'invention, l'insérat codant pour le récepteur peut être placé en aval d'une "séquence
25 leader" ou "séquence signal" et en phase avec celle-ci, pour former une unité de transcription, cette séquence "leader" devant alors faciliter le transport du produit d'expression de l'insérat jusqu'à la membrane de l'hôte unicellulaire. Cette séquence "leader" code normalement
30 pour une séquence N-terminale d'un précurseur d'une protéine de l'hôte unicellulaire, normalement transportée à la membrane de la cellule, ce peptide N-terminal étant normalement clivé à l'occasion du transport de la protéine naturelle correspondante à la membrane de
35 l'hôte unicellulaire. De la même façon le gène de fusion

entre cette séquence "leader" ou signal et l'insérat doit normalement être exprimé sous la forme d'une protéine hybride clivée en aval de la séquence signal à l'occasion du transport du récepteur à la membrane de l'hôte unicellulaire.

En variante, l'insérat est fusionné à une séquence codant pour tout ou partie d'une protéine hydrophile (par exemple la β -galactosidase) cette fusion permettant d'assurer la solubilité de la protéine hybride, produit de l'expression de l'insérat et de la séquence codant pour la protéine hydrophile, pendant le transport du récepteur résultant de l'expression de l'insérat dans l'hôte unicellulaire et dans la membrane de celui-ci.

L'invention se rapporte encore aux organismes unicellulaires eux-mêmes transformés par un vecteur modifié tel que décrit plus haut, et plus particulièrement des cultures d'organismes unicellulaires portant à leur surface des sites ou déterminants reconnus par les ligands spécifiques des récepteurs membranaires de mammifères correspondants.

Pour mettre en oeuvre l'invention et réaliser l'expression de la séquence nucléotidique correspondant à la protéine choisie, on utilisera de préférence un organisme unicellulaire sélectionné parmi les bactéries, les levures ou tout autre organisme unicellulaire acceptant le vecteur modifié selon l'invention et permettant sa répllication ainsi que l'expression de la protéine choisie et son transport à la surface de la cellule.

L'invention est également relative à un procédé pour l'obtention d'organismes unicellulaires comportant, exposés à leur surface, des sites caractéristiques d'un récepteur membranaire de mammifère, ce procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend :

a/ - la transformation d'un organisme unicellulaire par un vecteur répliquable dans cet organisme, préalablement modifié contenant un promoteur reconnu par les polymérases de l'hôte unicellulaire et fonctionnel dans celui-ci et un insérat placé sous le contrôle de ce promoteur et codant pour une séquence d'acides aminés normalement contenue dans un récepteur membranaire de mammifère tel qu'il a été décrit plus haut.

b/ - la sélection des organismes unicellulaires transformés, dans lesquels le susdit insérat est exprimé ou exprimable sous une forme telle que sa structure comprenne un ou plusieurs sites, exposés à l'extérieur des membranes cellulaires et capable(s) d'être reconnu par un ligand correspondant. En variante la détection de l'expression peut être réalisée en ayant recours à des anticorps spécifiques, notamment monoclonaux, reconnaissant spécifiquement les mêmes sites.

Lorsque l'organisme unicellulaire est transformé par un vecteur modifié contenant un promoteur inductible en amont de la séquence nucléotidique à exprimer, une étape intermédiaire entre les étapes a/ et b/ précitées est nécessaire, cet étape consistant en l'induction dudit promoteur, notamment sous l'effet de la substance appropriée (par exemple l'IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside) dans le cas du promoteur de l'opéron lactose par le tryptophane dans le cas du promoteur de l'opéron tryptophane) ajoutée au milieu de culture lorsque cette induction est souhaitée.

La présente invention est encore relative à un procédé de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme un ligand vis-à-vis d'un récepteur membranaire, ce procédé comprenant :

a/ - la mise en contact de la molécule avec un organisme unicellulaire préalablement transformé par un vecteur lui-même modifié par un insérat codant pour ce

récepteur membranaire, cet organisme portant à sa surface un ou plusieurs sites spécifiques de ce récepteur, le cas échéant après induction de l'expression de cet insérat, cette mise en contact étant effectuée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins de ces sites spécifiques et ladite molécule dès lors qu'elle s'avèrerait effectivement posséder une affinité pour ce récepteur.

b/ - la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-récepteur.

Les conditions permettant la formation de la susdite liaison, correspondent normalement à celles dans lesquelles celles-ci se forment entre les récepteurs naturels et les ligands concernés.

L'invention est aussi relative à un procédé pour l'étude de l'affinité d'un récepteur de mammifère appartenant à la classe de ceux qui sont couplés à une protéine G, pour un ou plusieurs ligands déterminés, caractérisé par :

- la transformation d'une culture unicellulaire avec un vecteur, notamment un plasmide ou un phage dans lequel avait auparavant été incorporée une séquence de nucléotides ou codant pour le polypeptide contenu dans ce récepteur de mammifère, sous le contrôle d'éléments de régulation, notamment d'un promoteur, permettant l'expression dans la culture unicellulaire utilisée de ladite séquence de nucléotides,
- la culture des organismes unicellulaires transformés dans des conditions permettant l'expression dudit insérat,
- la mise en contact de ces organismes unicellulaires avec ces ligands déterminés,
- la détection d'une réaction affine entre lesdits organismes unicellulaires transformés et lesdits ligands déterminés.

L'invention vise également une trousse (ou kit) pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un récepteur membranaire de mammifère déterminé, comprenant :

- 5 - une culture d'organismes unicellulaires transformés par un vecteur modifié tel que décrit dans les pages précédentes, dans lequel l'insérat code pour le susdit récepteur membranaire,
- des moyens physiques ou chimiques pour induire
10 l'expression de la séquence nucléotidique contenue dans le vecteur modifié, lorsque le promoteur placé en amont de cette séquence est un promoteur inductible par lesdits moyens physiques ou chimiques,
- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités
15 déterminées pour ledit récepteur membranaire,
- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique de ladite protéine.

L'invention fournit donc des moyens permettant aussi l'étude du comportement de protéines fonctionnelles en tant que récepteurs, grâce à l'exposition de
20 leurs sites spécifiques à la surface d'organismes unicellulaires lorsque ceux-ci auront auparavant été transformés par des vecteurs contenant un insérat codant pour ladite protéine fonctionnelle. Elle permet aussi la détection ou la vérification de l'affinité d'une protéine
25 en tant que récepteur vis-à-vis d'un ligand déterminé. Elle permet encore l'étude de la spécificité de liaison de ces récepteurs vis-à-vis de différents ligands choisis pour leur intérêt, par exemple dans la perspective
30 de traitements thérapeutiques futurs.

Un avantage particulier de l'invention résulte dans la substitution des récepteurs dont la purification est extrêmement difficile et la durée de conservation minime, par des cellules exprimant -ou susceptibles
35 d'exprimer à leurs surfaces, les sites caractéristiques

de récepteurs qui peuvent être reconnus par les ligands étudiés. Ces cellules peuvent être aisément conservées, surtout lorsque le vecteur modifié comprend un promoteur inductible au moment de l'emploi. Grâce à leur capacité à être cultivée, les cellules permettent la régénération à la demande des sites spécifiques de ces récepteurs en quantités pratiquement illimitées.

Les cultures d'organismes unicellulaires transformés par un vecteur modifié précédemment décrit peuvent être notamment conservées en l'attente d'usage notamment en les plaçant dans du glycérol 20% en final dans la solution à -70°C. Elles peuvent encore être conservées sous forme de spores.

L'invention se prête à de nombreuses applications. On en mentionne quelques unes ci-après à titre d'exemples.

Des applications particulièrement intéressantes en particulier dans le domaine de la thérapie consistent dans l'étude de la capacité de substances β -bloquantes nouvelles susceptibles d'agir au niveau des récepteurs β -adrénergiques, notamment β 1-adrénergiques (au niveau du coeur) ou β 2-adrénergiques (dans le poumon).

On a constaté que de nombreuses substances dites β -bloquantes se lient à la fois aux récepteurs β 1 et β 2-adrénergiques. Certains traitements thérapeutiques nécessitent cependant l'utilisation de médicaments spécifiques de l'un ou l'autre de ces récepteurs et impliquent donc la détermination de sous-types de récepteurs, capables de se lier à des ligands spécifiques. L'invention permet la réalisation de cultures unicellulaires capables de faciliter le criblage des ligands selon les natures de leurs activités vis-à-vis des différents types de récepteurs β -adrénergiques : elle permet donc la détermination

aisée des spécificités pharmacologiques et thérapeutiques de médicaments à l'étude.

L'invention fournit aussi des moyens simples pour l'étude des effets de modifications introduites dans des récepteurs, vis-à-vis de leurs interactions avec des substances chimiques, notamment de ligands connus pour leur aptitude à se lier avec ces récepteurs dans leurs formes non modifiées.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et dans les exemples, notamment en rapport avec les dessins et le tableau dans lesquels :

- la figure 1 représente de façon schématique les régions codant pour le récepteur humain $\beta 2$ -adrénergique (hu- $\beta 2$ R) recombiné avec le gène de la β -galactosidase (lac Z) du phage λ gt11 (11).

- La figure 2 témoigne des variations de l'affinité de liaison entre les molécules d'un ligand, le ICYP et des cellules intactes de E.coli exprimant la séquence hu- $\beta 2$ R de la figure 1 contenue dans le gène de fusion.

- La figure 3 témoigne de l'expression détectée à l'aide d'un marquage par photo-affinité de récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques exprimés dans la membrane de E.coli.

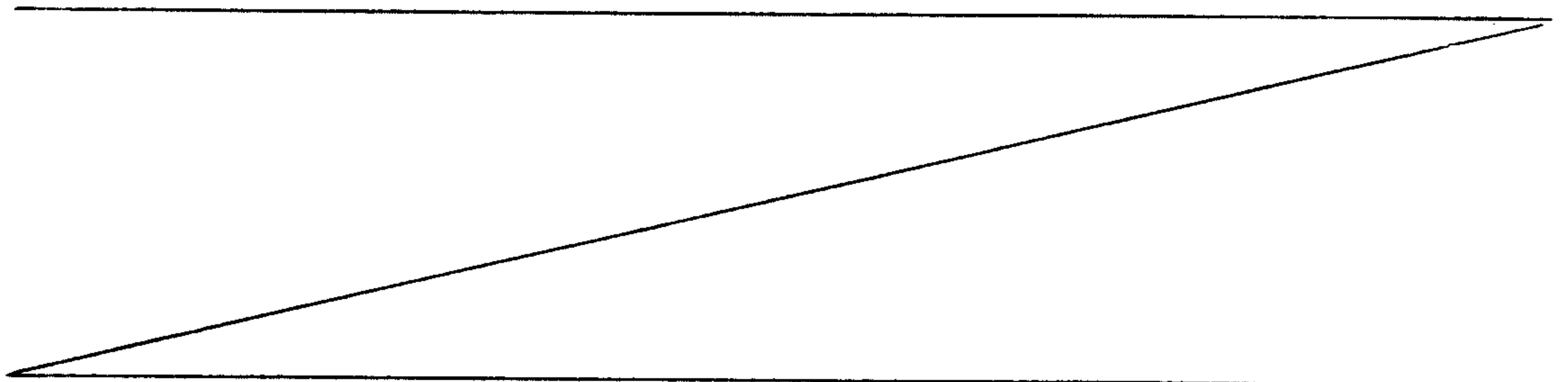
- Le tableau 1 contient les résultats observés avec des ligands β -adrénergiques liant le récepteur hu- $\beta 2$ exprimé dans des cellules E.coli intactes et leur comportement en présence d'agonistes et d'antagonistes compétitifs.

Sur la figure 1 apparaissent les sites de restriction utilisés pour la construction du gène de fusion. Le codon d'initiation pour le gène hu- $\beta 2$ R est compris dans le site de restriction NcoI et son codon de terminaison est localisé 19 paires de bases en amont vers l'extrémité 5' du site de restriction Dra I.

Dans la partie inférieure de la figure, à la jonction entre les deux gènes, l'adaptateur synthétique

s'étendant des sites Eco RI à NcoI et qui maintient le cadre de lecture du gène lac Z en correspondance avec celui du gène hu- β 2 R est souligné. La séquence d'acides aminés correspondante est représentée sous la séquence
5 nucléotidique, en utilisant les codes suivants pour la désignation des aminoacides :

	M	Méthionine
	L	Leucine
	I	Isoleucine
10	V	Valine
	F	Phénylalanine
	S	Sérine
	P	Proline
	T	Thrénine
15	A	Alanine
	Y	Tyrosine
	H	Histidine
	Q	Glutamine
	N	Asparagine
20	K	Lysine
	D	Acide Aspartique
	E	Acide glutaminique
	C	Cystéine
	W	Tryptophane
25	R	Arginine
	G	Glycine



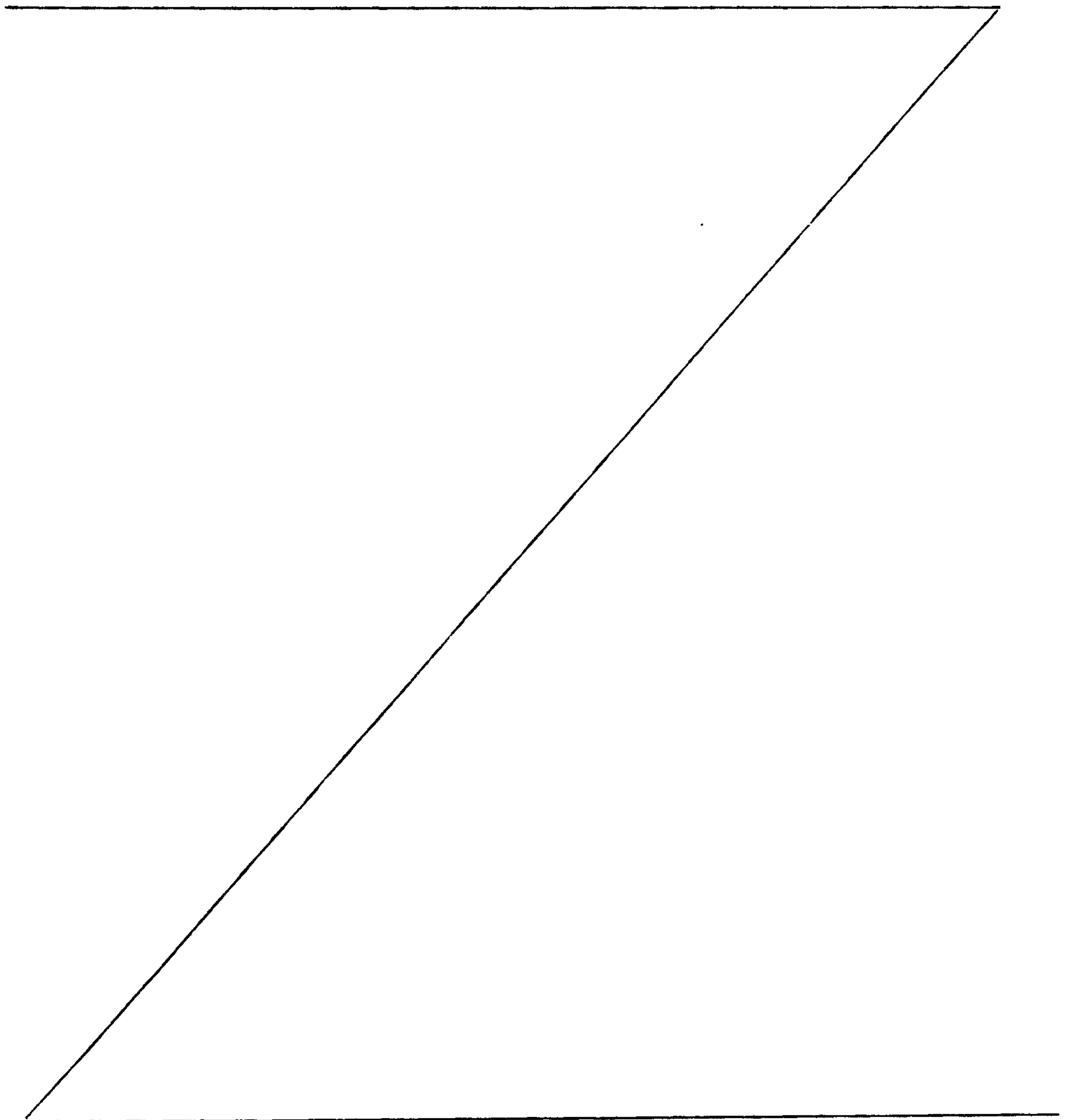
- la figure 4 représente la construction des plasmides pSML β 1 et pSML β 2,
- la figure 5 représente successivement :
 - A : courbes de saturation et la représentation de scatchard (voir l'encadré) de l'ICYP par rapport aux bactéries intactes exprimant Hu β 1AR ou Hu β 2AR. Les résultats correspondent à deux expériences réalisées sur la même culture de bactéries et sont représentatives de 4 préparations différentes. Une classe de sites de liaison est présente sur chaque récepteur. Le K_D calculé est $16,40 \pm 0,45$ pM pour Hu β 1AR et $17,00 \pm 0,36$ pM pour Hu β 2AR.
 - B et C : représentent des expériences d'inhibition de liaison réalisées sur Hu β 1AR (B) et sur Hu β 2AR (C) exprimés par E.coli intact pour déplacer 10pM de ICYP (-)Epinephrine (Δ), (-)Norepinephrine ($\blacktriangle$), (-)propanolol ($\square$), (+)propanolol ($\blacksquare$), CGP 20712-A ($\bullet$) ICI118,551 ($\circ$)
- figure 6 : cette figure représente le marquage photoaffine de Hu β 1AR (lignes b et c) et Hu β 2AR (lignes a) sur E.coli intact. Des expériences ont été réalisées en présence (lettres soulignées) ou en l'absence de propanolol froid de façon à montrer la liaison spécifique. Les flèches indiquent le poids moléculaire attendu des Hu β ARs séparés du polypeptide LamB.
- figure 7 : la figure 7 est une représentation schématique de la procédure proposée pour le criblage de ligands interagissant avec les récepteurs β -adrénergiques.

Exemple 1 : Expression du récepteur humain $\beta 2$ -adrénergique dans E.coli.

1/ CONSTRUCTION DU GENE RECOMBINANT.

5 Dans cette étape il s'agit d'insérer la région codante du récepteur humain $\beta 2$ -adrénergique dans le vecteur d'expression λ gt11 au niveau du site de restriction Eco RI, près de l'extrémité 3' du gène lac Z codant pour la β -galactosidase.

10 Dans une première étape, un adaptateur syn-



thétique (linker) s'étendant du site Eco RI au site NcoI) est lié au fragment d'ADN purifié de 1,3kb s'étendant des sites NcoI à DraI, contenant la région codante du récepteur humain β 2-adrénergique.

5 Cet adaptateur contient une séquence codant pour la séquence d'acides aminés Asp-Asp-Pro et facilitera la séparation de la protéine de fusion obtenue après l'étape ultérieure d'expression du gène recombinant, par hydrolyse de la liaison Asp-Pro, au moyen d'un
10 clivage acide doux.

Après extraction au phénol et précipitation à l'isopropanol, des adaptateurs Eco RI ont été liés à cette construction qui, après digestion par Eco RI et purification, a été insérée au niveau du site unique
15 EcoRI dans le vecteur λ gt11. Un contrôle a été effectué pour vérifier que les sites de restriction Eco RI et NcoI ainsi que l'orientation du gène inséré avaient été préservés.

Le fragment de recombinaison (ou gène recombinant) obtenu entre le fragment issu du gène lac Z et le fragment hu- β 2 R par l'intermédiaire de l'adaptateur sont représentés à la figure 1. Elle fait également apparaître en traits fins les parties 3' et 5' de l'ADN de λ gt11, de part et d'autre du fragment de recombinaison.
25

2/ EXPRESSION DU GENE RECOMBINANT DANS E.coli.

Le vecteur recombinant obtenu a été inséré dans une souche Y1089 E.coli par lysogénisation de cette dernière avec le phage recombinant par une technique
30 classique, notamment celle décrite dans (11). Les cellules ont été récoltées et remises en suspension dans un tampon 10mM tris, pH 7,4, 90mM NaCl. L'expression de la protéine de fusion peut être obtenue après induction du promoteur par un choc thermique et par la mise en co-

tact des cellules transformées avec l'isopropyle β -D-thio-galactopyranoside (IPTG). Une analyse du lysat bactérien par un test immunoblot en présence d'anticorps anti- β -galactosidase a montré la présence de produits
5 dont la taille variait entre 100 et 162kDa.

3/ ETUDE DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS AINSI EXPRIMES A LA SURFACE DE E.coli, AVEC DES LIGANDS CAPABLES DE FORMER DES LIAISONS DU TYPE RECEPTEUR-LIGAND.

10 Pour réaliser cette étude on utilise plusieurs ligands- β -adrénergiques ainsi que des contrôles négatifs comprenant par exemple la bactérie E.coli transfectée avec le vecteur d'expression dépourvu de séquence nucléotidique codant pour le récepteur β -adrénergique, ou
15 encore ce vecteur contenant la susdite séquence insérée dans le sens opposé au sens de lecture.

Des cellules E.coli Y1089 exprimant le gène chimérique sous forme d'une protéine de fusion, sont en suspension dans une solution de 10mM Tris (à pH 7,4), et
20 90mM NaCl. Des aliquots contenant 6×10^7 cellules sont ensuite, après induction de l'expression du récepteur, incubés pendant 1 heure à 37°C dans un volume final de 1ml de ICYP ($[^{125}\text{I}]$ iodocyanopindolol, 2080Ci/mmol, des Laboratoires AMERSHAM) à différentes concentrations (de
25 1 à 80pM).

Les réactions sont stoppées par filtration sur des filtres WHATMAN GF-F*, suivie par 4 lavages rapides avec 4 ml de tampon. L'existence de fixations non spécifiques est déterminée en présence de 1 μM de propa-
30 nolol ; ces fixations sont inférieures à 23%.

La figure 2 représente la courbe montrant la variation de la proportion de ligand fixé par 6×10^7 bactéries, en fonction de la concentration en ligand (ICYP) (de 1 à 80 pM de $[^{125}\text{I}]$ ICYP). Cette courbe est
35

* Marque de commerce

une courbe de saturation ; elle correspond à une classe unique de sites de fixation caractérisés par un K_d de $5,3 \pm 1,9 \times 10^{-12}$ M ($r=0,93$). Le calcul montre que le nombre maximum de sites permettant la liaison du récepteur au ligand est de $25,5 \pm 5,2$ par bactérie.

Les expériences semblables réalisées avec des bactéries infectées par le vecteur λ gt11 sauvage (dépourvu du gène du récepteur humain β_2) ou avec des bactéries infectées par un phage contenant le gène de ce récepteur, inséré dans la direction opposée, a montré que moins de 0,5% de liaisons a été mesuré.

On a noté que l'expression du récepteur humain β_2 -adrénergique est maximale après 2 heures d'induction et stable jusqu'à 20 heures. Ceci correspond à la densité de bactéries maximum ; cette observation suggère qu'il existe un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne du produit exprimé par le gène inséré dans le vecteur d'expression.

La fixation ou la liaison du ligand peut être déplacée par des ligands distincts susceptibles d'entrer en compétition avec le premier (voir par exemple le déplacement complet du ligand ICYP par le ligand hydrophile CGP 12177 dans les essais décrits plus loin en rapport avec le tableau. Après séparation du cytoplasme l'activité reste liée avec les membranes (voir discussion de la fig. 3).

Les cellules intactes non induites ont pu être conservées dans un mélange de 10mM Tris, 90mM NaCl à pH 7,4 pendant au moins 3 jours à 4°C, sans qu'il y ait perte de leur activité de liaison à l'égard du ligand.

4/ MARQUAGE PAR PHOTOAFFINITE DU RECEPTEUR β_2 -ADRENERGIQUE EXPRIME DANS LA MEMBRANE DE E.COLI.

Des bactéries préparées selon un protocole

analogue à celui décrit dans l'étape précédente, sont resuspendues dans un volume correspondant à 1/20 de leur volume de culture d'origine dans un tampon contenant 10 mM Tris (à pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,5 mM de fluorure de sulfonyle-phénylméthane, 2 mM EDTA, 5 µg par ml de leupeptine, 7 µg par ml de pepstatine, 10.000 U par ml de trasylol et 4 µg par ml de benzamidine. Ce tampon sera encore utilisé dans toutes les étapes ultérieures.

Les cellules sont ensuite congelées (dans de l'azote liquide) puis dégelées 4 fois jusqu'à obtenir leur lyse complète. L'ADN est ensuite brisé par ultrasons (3 périodes de 10 secondes à 10 watts) pour diminuer la viscosité, et le lysat est centrifugé 20 minutes à 6.000 g pour en retirer les débris et les cellules non lysées.

Le surnageant a ensuite été centrifugé pendant 2 heures à 100 000 g. Le culot de centrifugation a été resuspendu dans 4 ml de tampon, homogénéisé dans un récipient de verre, et l'activité de liaison avec l'ICYP a été mesurée à la fois dans le culot de centrifugation et dans les fractions de surnageant.

L'activité associée avec les protéines cytoplasmiques était de 0% (déterminée par précipitation dans 12% de polyéthylène glycol 6.000) alors que 26,6% de l'activité de liaison ou fixation initiale a été retrouvée dans la fraction membranaire.

Pour le marquage en photoaffinité, environ 200 fmoles de sites capables de se lier avec l'ICYP, ont été incubés dans 1 ml dans l'obscurité pendant 1 heure avec 500 pM de ICYP-D (Iodo-Cyano-Pendolol-Diazirine) (AMERSHAM 1800 Ci/mmol) à 37°C, en présence ou non de 5 µM (-) propanolol. 4 ml de tampon ont été ajoutés, et les membranes ont été lavées 3 fois par centrifugation (15 minutes à 45.000 g) et resuspendues. Une photolyse a

été effectuée dans des conditions décrites précédemment (15). Les membranes marquées ont été solubilisées dans un tampon Laemmli (16) contenant 5% SDS, puis soumises à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% et
5 autoradiographiées.

Ces résultats montrent que l'activité du récepteur est pour l'essentiel concentrée dans les membranes, comme en témoignent les identifications des produits de fusion repérés à 162 kDa et du récepteur
10 libre (46 kDa).

Les données présentées dans le tableau résultent d'expériences de liaison par compétition réalisée avec des bactéries telles que celles auxquelles la figure 2 se réfère en utilisant 20 pM d'ICYP comme
15 ligands marqués radioactivement, et différentes concentrations de ligands différents capables d'entrer en compétition avec le premier. L'analyse des effets de compétition des ligands sur les courbes de liaison du ligand ICYP aux cellules et la détermination des valeurs
20 IC_{50} ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un programme d'ordinateur adapté aux tests dans le cadre de compétitions simples (12).

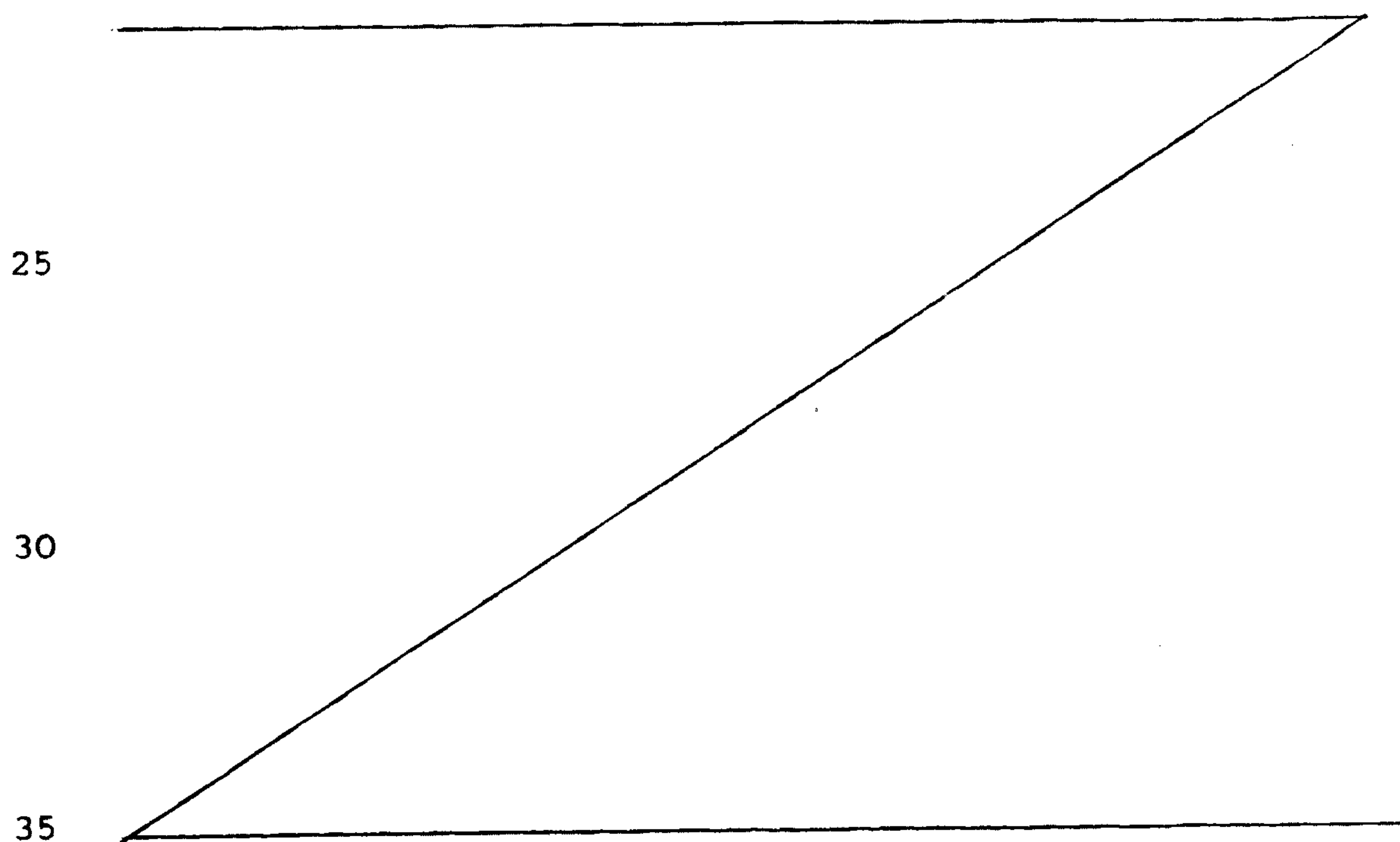
Chaque substance de compétition a été testée de 2 à 4 fois dans des expériences indépendantes. Les
25 valeurs K_i ont été calculées à partir des valeurs IC_{50} , tel qu'il est rapporté dans (14).

Les stéréoisomères sont indiqués par (+) ou (-).

Les profils pharmacologiques découlant des possibilités de déplacement du ligand fixé (ICYP) ou non
30 sous l'effet des autres substances se sont avérés être de même nature que ceux qui caractérisent les mêmes récepteurs dans leurs hôtes cellulaires normaux (de mammifères).

Cependant, contrairement à ce que l'on observe dans l'hôte cellulaire normal, aucun couplage ou aucune interaction apparentés n'ont été observés entre le récepteur humain $\beta 2$ -adrénergique et l'adenylate-cyclase en particulier à l'occasion de la mise en contact des ligands actifs avec les cellules transformées, en particulier l'isoproterenol, et ce bien que E.coli contienne le facteur d'élongation Tu, qui est lui-même une protéine G capable de contrôler des synthèses de protéines (17) et d'agir en tant que régulateur de l'activité adenylate-cyclase. Ce manque apparent de couplage est peut être à mettre au compte de différences entre les protéines G de bactéries et les protéines G de mammifères.

Une souche de culture cellulaire de E.coli transformée par un vecteur modifié selon l'invention par le gène hu- $\beta 2$ -adrénergique et désignée par HU- $\beta 2$ -Coli a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut de Paris (CNCM) sous le numéro I-737 le 3 mars 1988.



composés	propriétés pharmacologiques	K _i (nM)
(-) norepinephrine	agoniste	9100 ± 1100
(-) epinephrine	agoniste	4700 ± 1400
(+) isoproterenol	agoniste	1400 ± 100
(-) isoproterenol	agoniste	110 ± 10
procaterol	agoniste B2	40 ± 8
CGP 20712-A	antagoniste B1	2500 ± 600
practolol	antagoniste B1	790 ± 220
CGP 12.177	antagoniste	4.8 ± 1.3

Tableau 1

Exemple 2

Expression dans E.coli des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques humains.

5 L'expression dans E.coli des récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques humains (désignés par Hu $\beta 1$ AR et Hu $\beta 2$ AR) en utilisant en tant que vecteur un plasmide dans lequel la région codante des gènes des récepteurs est fusionnée en phase, avec l'extrémité 5' du gène Lamb
10 (23). Des clones stables de bactéries transformées produisant des récepteurs pharmacologiquement actifs ont été obtenus. Le profil pharmacologique de chaque récepteur exprimé dans E.coli est analogue à celui observé dans les tissus de mammifères de référence. Ce
15 nouveau système d'expression constitue un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention. Des clones bactériens exprimant un type de récepteur humain β -adrénergique constituent donc un outil approprié pour le criblage rapide de molécules
20 synthétiques nouvelles.

Procédure expérimentale

Souches bactériennes et plasmides

Les souches de E.coli JM101 (25) et pop6510 (24) constituent respectivement les souches réceptrices
25 pour la transformation avec des plasmides dérivés de Puc19 (25) et AJC-264 (24).

Le clonage et le séquençage du gène Hu $\beta 2$ AR ont été décrits antérieurement (3). Le gène Hu $\beta 1$ AR a été sélectionné à partir d'une banque de données
30 placentaire humaine dans Emb14, en utilisant comme sonde la région codante du gène du récepteur β -adrénergique de dindon décrite par Yarden et al (Proc. Natl. Acad. Sci 83 p 6795-6799, 1986). La carte de restriction du clone Hu $\beta 1$ AR a d'abord été sous-clonée au site EcoRI de Puc19 décrit dans (12). Un site de

restriction NcoI naturellement présent dans le gène Hu β 2AR a été créé au niveau du premier codon dans le gène de Hu β 1AR. Cette étape a été réalisée en supprimant la région codante 5' et en la remplaçant 5 avec un oligonucléotide synthétique reconstituant une séquence codon équivalente.

Les plasmides pSML β 1 et pSML β 2 portant les gènes hybrides LamB-Hu β AR sont dérivés de plasmides multicopies AJC-264 (24). Le plasmide AJC-264 contient 10 le gène LamB sous le contrôle du promoteur ptac12 (23). LamB code pour une protéine de la membrane externe de E.coli, impliquée dans la perméabilité au maltose et au maltotriose. Ce plasmide contient également une portion de 1,1Kb comprenant le gène 15 lacI^q et son promoteur. L'expression de LamB est ainsi réprimée à un niveau de base de 1500 monomères. Par induction avec de l'IPTG (10³M) un accroissement de 30 à 40 fois de l'expression de LamB est obtenu (23).

Le plasmide AJC-264 a été coupé par NcoI et StuI 20 : le site NcoI correspond à l'acide aminé 279 de la protéine LamB mature et le site StuI est situé à une distance de 82 paires de bases suivant le dernier codon de LamB. Le fragment NcoI-HindIII de Hu β 2AR et le fragment NcoI-Bgl2 de Hu β 1AR ont été sous-clonés 25 dans les sites NcoI-StuI de pAJC-264. Dans cette construction le même cadre de lecture a été maintenu entre la protéine LamB et les Hu β ARs. La purification des fragments d'ADN a été réalisée par migration sur de l'agarose 0,8% à bas point de fusion (LMP Agarose 30 Pharmacia) ; les ligations ont été réalisées directement sur le gel en suivant la procédure décrite dans (26). La souche E.coli 6510 a été transformée avec les plasmides recombinants conformément aux techniques standards (26).

Milieux et conditions de cultures

5 Les souches recombinantes et les souches de contrôle E.coli ont été cultivées sur un milieu Luria (L-broth) (1% tryptone, 1% NaCl, 0,5% d'extrait de levure, pH ajusté à 7) ou sur un milieu solide L-agar (L-broth solidifié avec 1,5% de bactoagar*,DIFCO) contenant 100 µg/ml d'un sel de sodium d'ampicilline (Sigma, St-Louis-USA).

10 Pour des préparations standard, 50ml de milieu (broth) ont été inoculés avec une colonie unique cultivée une nuit sur des plaques de L-agar solide et incubée à 37°C avec une aération forte. Lorsque la densité optique mesurée à 600nm a atteint 0,4-0,6, de l'IPTG en concentration finale 0,1mM (Sigma, 15 St.Louis-USA) a été ajouté et les cultures ont été placées à 23°C pendant 4 heures. Pour réaliser une préparation plus importante jusqu'à 1 litre, la même procédure générale a été suivie, excepté que le milieu a été inoculé dans une suspension de bactéries en 20 phase exponentielle de croissance, de façon à commencer la culture à 0,05 OD_{600nm}. Les bactéries ont finalement été centrifugées à 1500 g, resuspendues dans un tampon contenant NaCl 100mM, Tris 10mM à pH 7,4 et conservées à 4°C.

25 Essais de liaison

Des aliquots contenant 6 x 10⁷ cellules ont été incubés pendant 1 heure à 37°C dans un volume final de 1 ml de ICYP ([¹²⁵I]iodocyanopindolol (2080 Ci/mmol, Amersham, UK) à différentes concentrations (de 1 à 30 80pM). Les réactions ont été arrêtées par filtration sur les filtres Whatman GF-F* par 4 lavages rapides avec 4ml de tampon. Le nombre de liaisons non spécifiques déterminé en présence de 1µM de propanolol (-) était inférieur à 25%. Aucune liaison spécifique

* Marques de commerce

et saturable n'a pu être mesurée sur le témoin E.coli transfecté avec le plasmide AJC-264. Des expériences de liaison par compétition ont été réalisées de la même façon que dans les essais de liaison directe en 5 utilisant 10 pM de ICYP en tant que ligand marqué radioactivement et des concentrations variées de réactifs de compétition. Chaque médicament inhibait totalement la liaison de l'ICYP au récepteur. Un programme d'ordinateur relatif à la compétition simple 10 a été utilisé pour l'analyse des courbes pour la détermination des valeurs IC_{50} . Les valeurs de K_i ont été calculées à partir des valeurs de IC_{50} tel que décrit dans (12).

Marquage par photoaffinité

15 Le marquage par photoaffinité a été réalisé sur une suspension de cellules dans 10mM Tris, à pH 7,5 avec 100mM NaCl. Chaque mélange de réaction de 1ml, contenant 500pM de [^{125} I]iodocyanopindolol-diazirine (CYPD, Amersham 1800 Ci/mMole) et environ 100-200pM 20 sites capables de se lier à l'ICYP, a été incubé pendant 1 heure à 37°C en l'absence et en présence de 5µM de (-) propanolol. 5ml de 10mM Tris à pH 7,5 ont été ajoutés et les cellules ont été centrifugées à 5.000xg pendant 10mn. Après une suspension dans 10ml 25 du même tampon, une photolyse a été réalisée et les cellules ont été lavées selon la méthode décrite dans (15). Des bactéries marquées ont été solubilisées dans un échantillon de tampon Laemmli contenant 10% de NaDodSO₄, incubées pendant 2 heures à température 30 ambiante, soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de NaDodSO₄ (16) et autoradiographiées.

Le tableau 2 correspond à la comparaison des K_i mesurées avec les ligands β -adrénergiques sur Hu β 1AR, Hu β 2AR et les tissus de mammifères de référence.

Résultats

Les régions codantes de Hu β 1AR et Hu β 2AR ont été fusionnées avec la partie 5' du gène LamB (codant pour les 279 premiers acides aminés de la protéine LamB) portant plusieurs copies du plasmide AJC-264 (24) sous le contrôle du promoteur ptac 12. Des souches E.coli K12, pop 6510 ont été transfectées avec les plasmides résultants, respectivement désignés par pSML β 1 et pSML β 2 (fig.4). Des clones stables ont été obtenus, qui présentent une liaison spécifique et saturable pour l'antagoniste β -adrénergique ^{125} I iodocyanopindolol (ICYP) sous induction avec l'IPTG (fig.5). Comme montré dans les tests de liaison par compétition (fig.5), E.coli transfecté avec pSML β 1 exprimait les récepteurs β -adrénergiques du type pharmacologique β 1 alors que les bactéries contenant pSML β 2 produisaient les récepteurs β -adrénergiques du sous-type β 2. Les récepteurs β 1 et β 2 adrénérgiques présentaient la stéréospécificité attendue, puisque la forme lévogyre du propranolol était liée au récepteur avec une plus grande affinité que la forme dextrogyre.

Environ 220 récepteurs Hu β 2AR ont été exprimés par bactérie; le nombre de récepteurs β 1 actifs était régulièrement autour de 50 par bactérie ; Ce nombre de récepteurs β 1 actifs pourrait être augmenté en diminuant la sensibilité de la protéine exprimée en protéases.

Pour visualiser les deux récepteurs au niveau moléculaire, des expériences de marquage photoaffine ont été réalisées sur les bactéries intactes, en utilisant comme ligand photoactivable, le dérivé diazirine de l'ICYP (fig.6). Les poids moléculaires attendus des protéines de fusion LamB-Hu β 1AR et LamB-Hu β 2AR sont respectivement de 83 et 72 KDa. Aucune de

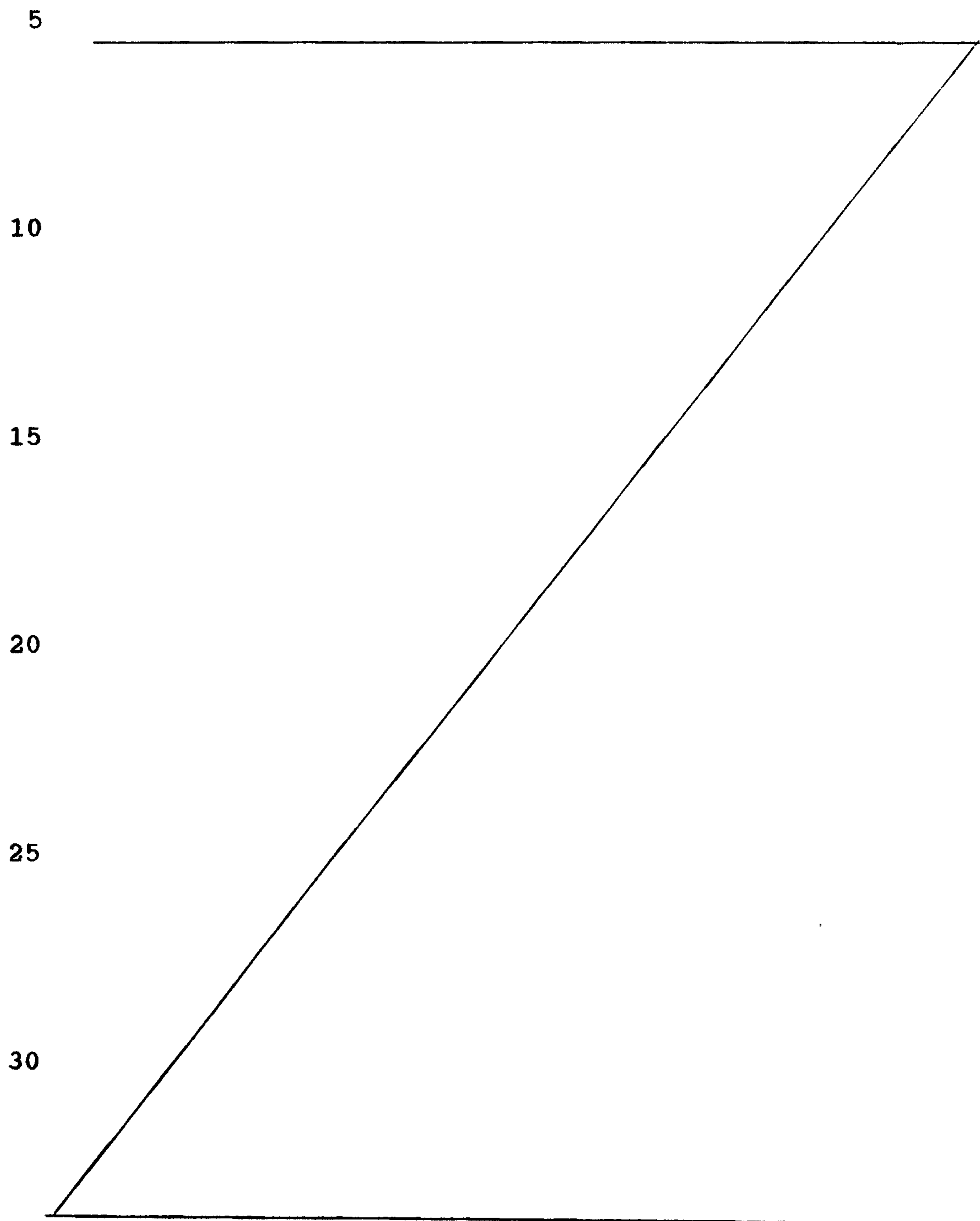
ces protéines n'est marquée avec le ligand photoactivable. Pour le récepteur $\beta 2$, la majorité des molécules marquées est sous la forme d'une protéine de 43 KDa ce qui correspond au poids moléculaire théorique du récepteur, clivé de son partenaire de fusion. Comme attendu, un nombre inférieur de récepteurs $\beta 1$ était marqué par rapport au nombre de récepteurs $\beta 2$ marqués. Quand l'expérience a été répétée sur un plus grand nombre de bactéries exprimant les récepteurs $\beta 1$, plusieurs formes moléculaires du récepteur actif ont été trouvées entre environ 40 et 70 KDa, comprenant Hu $\beta 1$ AR libre (poids moléculaire d'environ 47 KDa), des produits de fusion clivés au niveau de l'entité LamB (poids moléculaire d'environ 43 jusqu'à 70 KDa) et une forme de dégradation importante de Hu $\beta 1$ AR (poids moléculaire de 40 KDa). Cette dernière forme correspond probablement au clivage protéolytique de l'entité Hu $\beta 1$ AR au niveau N-terminal ou au niveau C-terminal de la molécule, avec conservation des 7 domaines transmembranaires potentiels, nécessaires pour la constitution d'un récepteur actif. Des expériences de Western blots réalisées sur des préparations membranaires des bactéries exprimant à la fois $\beta 1$ et $\beta 2$, avec des anticorps polyclonaux anti-LamB, ont montré que la protéine de fusion non marquée avec le ligand photoactivable constitue en fait le produit immunoréactif majeur.

Le nombre de sites actifs exprimés par les bactéries est suffisant pour réaliser des études pharmacologiques des ligands susceptibles de se lier aux récepteurs β -adrénergiques. Avec 1 litre de culture amené à 1,5 OD_{600 nm}, environ 20.000 essais ont été réalisés et les bactéries ayant subi l'induction à l'IPTG ont été conservées dans 15% de glycérol à -70°C

pendant une période d'au moins 2 semaines, sans qu'une perte de plus de 20% de leur activité soit constatée. Une série de composés connus pour leur capacité de liaison avec les récepteurs β -adrénergiques de mammifères a été testée dans des expériences de liaison par compétition sur 2 clones bactériens. Comme le montre le tableau 2, la constante K_i calculée et le rapport $K_{i\beta 1}/K_{i\beta 2}$ sont proches de ceux déterminés dans les tissus de mammifères de référence. On en déduit que l'environnement membranaire de E.coli, qui diffère de celui des cellules de mammifères, n'affecte pas les propriétés particulières de liaison des récepteurs. Les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs β -adrénergiques exprimés dans E.coli ainsi que les avantages de la culture bactérienne montrent que les clones bactériens exprimant des récepteurs membranaires constituent des outils particulièrement intéressants pour le criblage de nouveaux composés synthétiques compte tenu du temps et du coût requis par des procédures mettant en oeuvre des membranes de mammifères enrichies en récepteurs (fig.7).

L'utilisation des vecteurs pSML β constitue un moyen préféré pour le niveau d'expression des récepteurs actifs comparé au résultat obtenu dans l'exemple 1 dans lequel Hu β 2AR avait été fusionné avec la β -galactosidase. Ceci pourrait être attribué aux propriétés de l'entité LamB, qui constitue une protéine de la membrane externe de E.coli, et facilite l'assemblage correct des récepteurs fusionnés. D'autres polypeptides bactériens de différentes tailles et propriétés pourraient être choisis comme partenaire de fusion pour l'expression des récepteurs transmembranaires. L'observation que le marquage photoaffine de Hu β 2AR correspond à la protéine native clivée du peptide LamB, a permis de transférer des

bactéries avec un plasmide similaire dans lequel le gène *Huβ2AR* était fusionné à l'extrémité 3' de la séquence de clivage du peptide signal de la protéine de la membrane interne, de la bactérie.



	ligands	E.coli Huβ1AR	E.coli Huβ2AR	E.coliKIβ1/KIβ2	mamm. β1AR	mamm. β2AR	mamm. β1/β2
1	epinephrine	696	861	0,81	1900	403	4,7
2	norepinephrine	345,3	4805	0,07	2800	1880	1,49
3	isoproterenol	38,2	134,8	0,28	236	110	2,14
4	procaterol	4652	55,3	84,1	-	-	-
5	propranolol	5,3	0,81	6,5	2,99	0,54	5,5
6	ICI 118,551	304,3	2,74	111,1	86	0,66	130
7	CGP 20712-A	3,54	7368	0,0005	3,24	982	0,003
8	clenbuterol	37	12	3,1	71	14	5,1
9	zinterol	168	9,14	18,4	170	21	8,1
10	R67555	0,13	3,83	0,03	0,90	46	0,02
11	L-643717-01	0,56	130	0,004	3,53	192	0,02

Tableau 2

REFERENCES

1. Frielle, T.Collins, S.Daniel, K.W.Caron,
M.G.Lefkowitz, R.J. & Kobilka B.K. Proc.Natl. Acad. Sci.
5 USA. 84.7920-7924(1987).
2. Dixon, R.A.F. et al. Nature 321, 75-79 (1986).
3. Emorine, L.Marullo, S.Delavier-Klutchko, C.Durieu-
Trautmann, O. & Strosberg, A.D.Proc. Natl. Acad. Sci.
USA. 84.6995-6999 (1987).
- 10 4. Kobilka, B.K., Matsui, H. Kobilka, T.S. Yang-Feng,
T.L.Francke, U.Caron, M.G.Lefkowitz, R.J.&Regan, J.W.
Science 238, 650-656(1987).
5. Kubo, T. et al. Nature 323, 411-416 (1986)
6. Bonner, T.I., Buckley, N.J. Young A.C. & Brann,
15 M.R.Science 237, 527-532 (1987).
7. Masu,Y.Nakayama, K.Tamaki,H.Harada, Y.Kuno, M.&
Nakanishi S.Nature 329, 836-838 (1987).
8. Spiegel, A.M.Mol. Cell. Endocrinol. 49, 1-16 (1987)
9. Engelman, D.M.Goldman, A.& Steitz, T.A.Meth.Enzym.88,
20 81-88 (1982).
10. Huynh, T.V.Young, R.A.& Davis R.W. in DNA Cloning, a
Practical Approach Vol.1, 49-78 (IRL,Oxford, 1985)
11. Minneman, K.P.Hegstrand, C.R.& Molinoff, P.B. Mol.
Pharmacol. 16,34-46 (1979).
- 25 12. Cheng, Y.& Prusoff, W.H.Biochem. Pharmacol.22, 3099-
3108 (1973).
13. Fowler, A.V.& Zabin I.J.Biol.Chem.258, 14354-14358
(1983)
14. Rousset, J.P.Gilson, E.& Hofnung M.J.Mol.Biol. 191,
30 313-320 (1986)
15. Cervantes-Olivier. P.Delavier-Klutchko, C.Durieu-
Trautmann, O.Kaveri, S.Desmandril, M.& Strosberg,
A.D.Biochem. J.Biochem J 250:133-143.
16. Laemmli, U.K.& Favre M.J.Mol. Biol. 80, 575-599
35 (1973)

17. Reddy. P. Miller, D.& Peterkofsky, A.J.Biol. Chem. 261, 11448-11451 (1986).
18. Stiles, G.Arch. Biochem. Biophys. 237, 65-71 (1985)
19. Cervantes-Olivier. P. Durieu-Trautmann, O. Delavier-
5 Klutchko, C.& Strosberg, A.D.Biochemistry 24, 3765-3770
(1985).
20. Hanada, K. Yamato, I.& Anraku, Y.J.Biol. Chem. 262, 14100-14104 (1987).
21. Allen M.Spiegel, Signal transduction by guanine
10 nucleotide binding proteins ; Molecular and Cellular
Endocrinology, 49(1987)1-16 Elsevier Scientific
Publishers Ireland, Ltd.
22. Marullo, S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:7551-7555. 1987
- 15 23. Boulain, J.C. et al. 1986. Mutagenesis by random linker
insertion into the lamB gene of Escherichia coli K12.
24. Charbit, A et al. 1986. EMBO J. 5:3029-3037
25. Yanisch-Perron, C. et al. 1985-Gene. 33.103-119
26. In Current protocols in molecular biology. 1989.
- 20 Ausubel, F.M. et al (Ed) Greene Publishing associates
and Wiley-Interscience, NEW YORK.

25

30

35

Les réalisations de l'invention au sujet desquelles un droit exclusif de propriété ou de privilège est revendiqué, sont définies comme il suit :

1. Vecteur répliquable dans une culture d'un hôte unicellulaire, ledit hôte unicellulaire étant choisi parmi les bactéries et les levures, ledit vecteur contenant un insérat de nucléotides codant pour une séquence d'acides aminés contenue dans une protéine de mammifère ayant une activité biologique de récepteur membranaire, l'insérat contenu dans le vecteur codant pour une séquence d'acides aminés comportant dans sa structure au sein de la membrane plasmique, sept segments transmembranaires hydrophobes entre lesquels s'intercalent des boucles extra et intracellulaires, une région aminoterminal extracellulaire et une région cytoplasmique carboxyterminale, et des sites de liaison constitués par des régions hydrophiles formées dans la membrane, ce vecteur étant caractérisé en ce que l'insérat est placé sous le contrôle d'une séquence, incluse dans ce vecteur autorisant l'expression de cet insérat dans ledit hôte unicellulaire, et comportant un promoteur reconnu par les polymérases de cet hôte unicellulaire, l'expression de l'insérat s'accompagnant également de l'exposition à l'extérieur de cet hôte unicellulaire des sites caractéristiques des récepteurs membranaires qui affleurent à la surface des cellules de mammifères d'origine.

2. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur inductible.

3. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'insérat code pour un récepteur humain α -adrénergique.

4. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'insérat code pour un récepteur humain β -adrénergique.

5. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'insérat code pour un récepteur muscarinique.

6. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'insérat code pour un récepteur neuropeptidique.

7. Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce que le récepteur est un récepteur pour la «Substance K».

8. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hôte unicellulaire est un hôte bactérien, et en ce que le promoteur bactérien est celui de l'opéron lactose.

9. Vecteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'insérat est dépourvu de la région promotrice qui lui est associée dans les cellules de mammifère, qui constituent l'hôte normal de la séquence codante contenue dans l'insérat.

10. Organisme unicellulaire transformé par un vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, et capable de synthétiser un polypeptide comportant, après induction de l'expression de l'insérat, des séquences affleurant à la surface de cet organisme, ledit organisme unicellulaire étant choisi parmi les bactéries et les levures et reconnues par un ligand reconnaissant le récepteur membranaire naturel.

11. Culture cellulaire transformée par un vecteur modifié selon la revendication 1 désignée par HU- β 2-coli et déposée à la CNCM sous le numéro I-737.

12. Procédé de détection de la capacité d'une molécule à se comporter comme ligand vis-à-vis d'un récepteur appartenant à la classe des récepteurs fixés à une protéine G, caractérisé par :

- la mise en contact de la molécule avec un organisme unicellulaire selon la revendication 10 préalablement transformé par un vecteur lui-même modifié par un insérat codant pour ce récepteur membranaire, cet organisme portant à sa surface un ou plusieurs sites spécifiques de ce récepteur, cette mise en contact étant effectuée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins de ces sites spécifiques et ladite molécule dès lors qu'elle

s'avérerait effectivement posséder une affinité pour ce récepteur; et

- la détection de la formation éventuelle d'un complexe du type ligand-récepteur.

13. Procédé pour l'étude de l'affinité d'un récepteur de mammifère appartenant à la classe de ceux qui sont couplés à une protéine G, pour un ou plusieurs ligands déterminés, caractérisé par :

- la transformation d'une culture unicellulaire avec un vecteur, dans lequel avait auparavant été incorporée une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide contenu dans ce récepteur de mammifère, sous le contrôle d'éléments de régulation, et selon laquelle est obtenue l'organisme unicellulaire transformé selon la revendication 10, permettant l'expression dans la culture unicellulaire utilisée de ladite séquence de nucléotides, et l'exposition à l'extérieur des cellules de cette culture unicellulaire des sites caractéristiques des récepteurs membranaires qui affleurent à la surface des cellules de mammifères d'origine;

- la culture des cellules transformées dans des conditions permettant l'expression dudit insérat;

- la mise en contact de ces cellules transformées avec ces ligands déterminés; et

- la détection d'une réaction affine entre lesdites cellules transformées et lesdits ligands déterminés.

14. Kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un récepteur membranaire de mammifère déterminé comprenant :

- une culture d'organismes unicellulaires transformés par un vecteur modifié tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 9;

- des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression de l'insérat nucléotidique contenu dans le vecteur modifié lorsque le promoteur placé en amont de cet insérat est un promoteur inductible par lesdits moyens physiques et chimiques:

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ledit récepteur membranaire; et

- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique dudit ligand.

15. Kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour un récepteur membranaire de mammifère déterminé comprenant :

- une culture d'organismes unicellulaires selon la revendication 10;

- des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression de l'insérat nucléotidique contenu

dans le vecteur modifié lorsque le promoteur placé en amont de cet insérat est un promoteur inductible par lesdits moyens physiques et chimiques:

- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ledit récepteur membranaire; et

- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique dudit ligand.

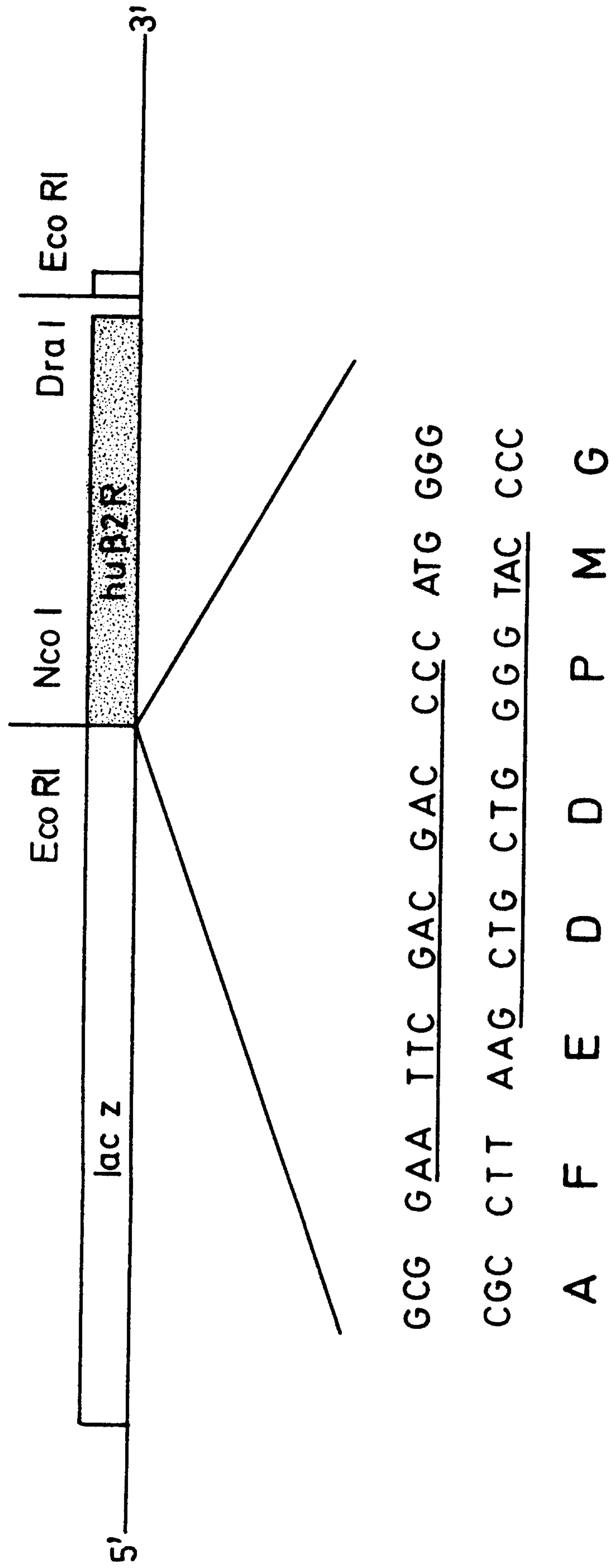


FIG.1



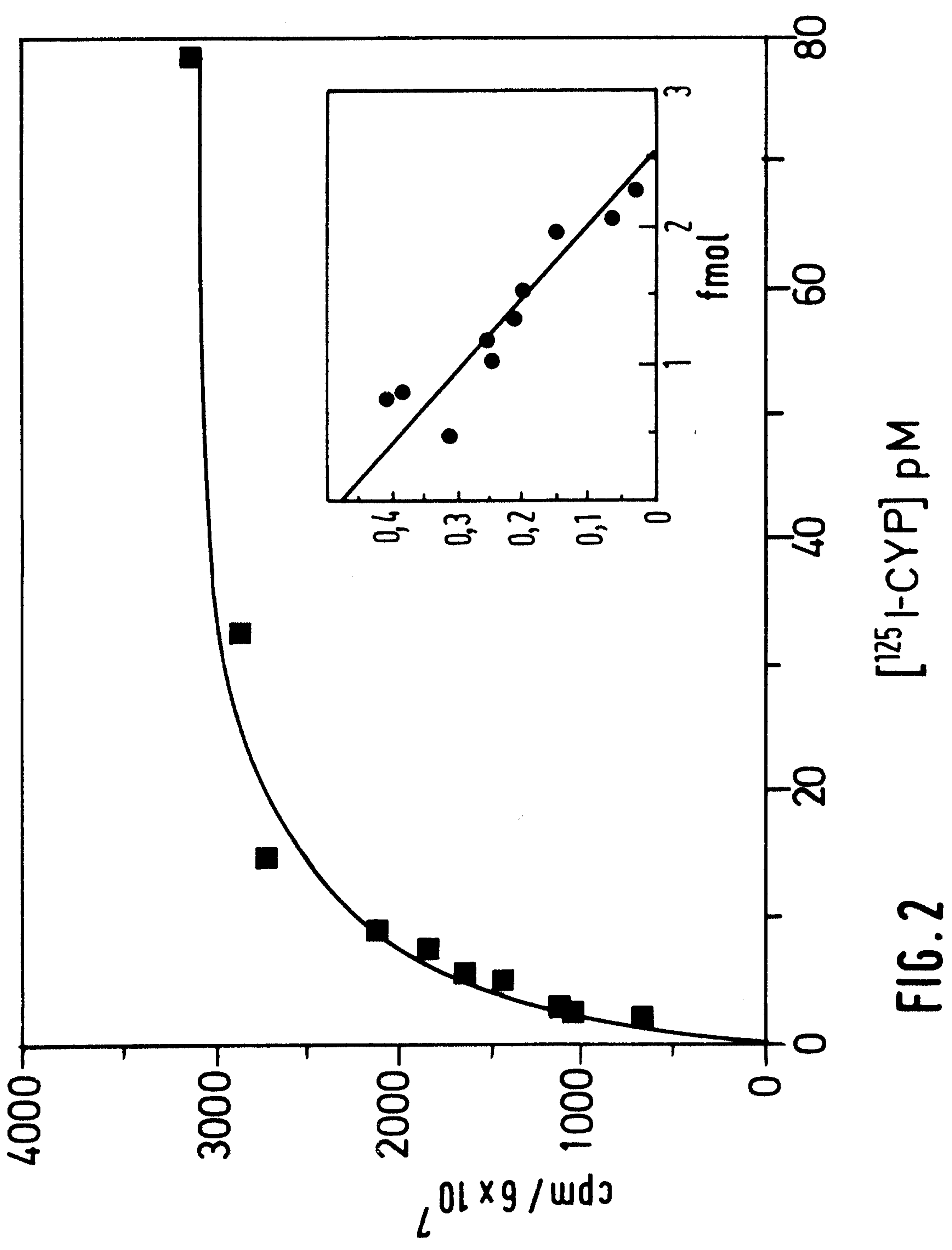


FIG. 2

3 / 8

1 3 4 1 4 4 8

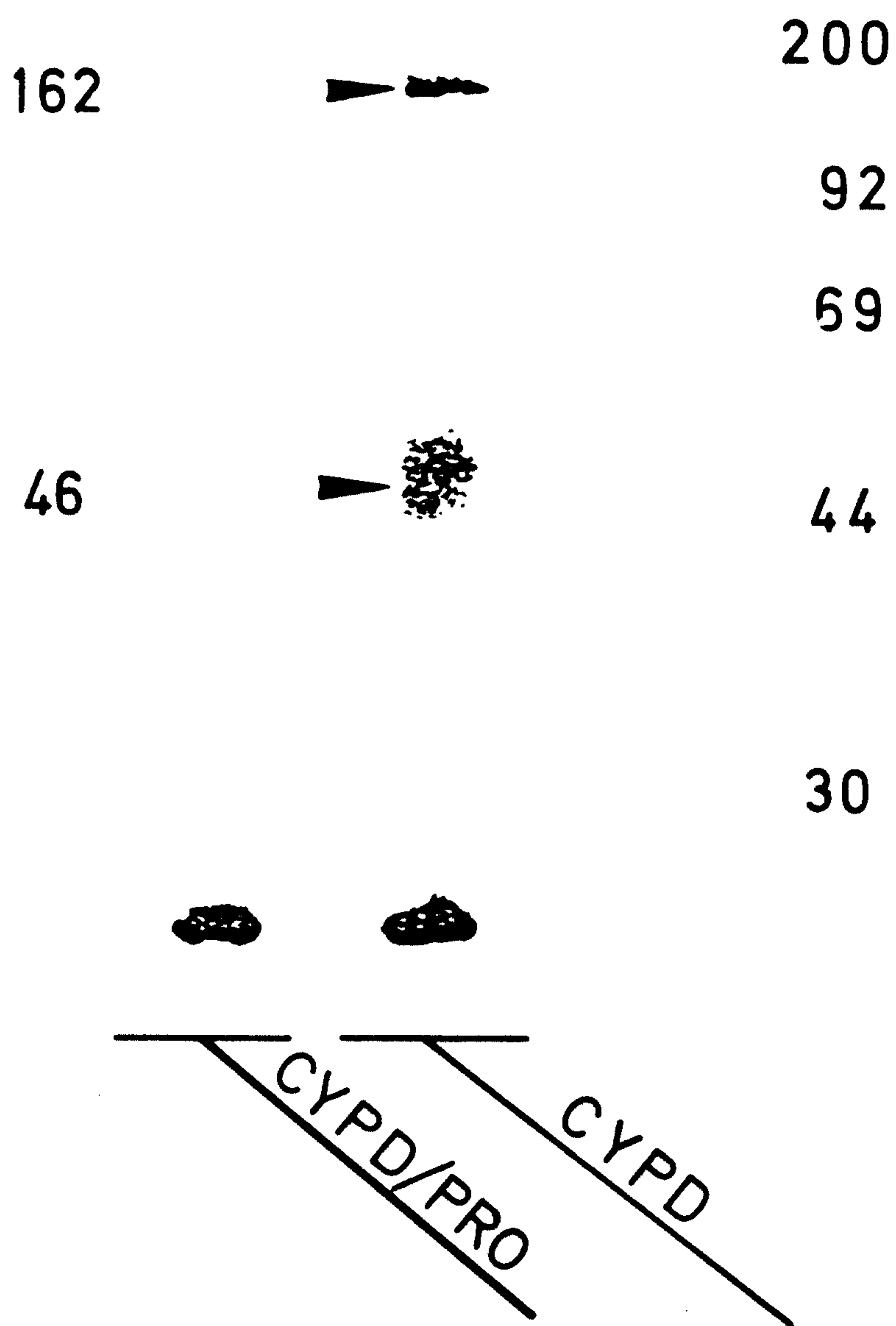


FIG. 3

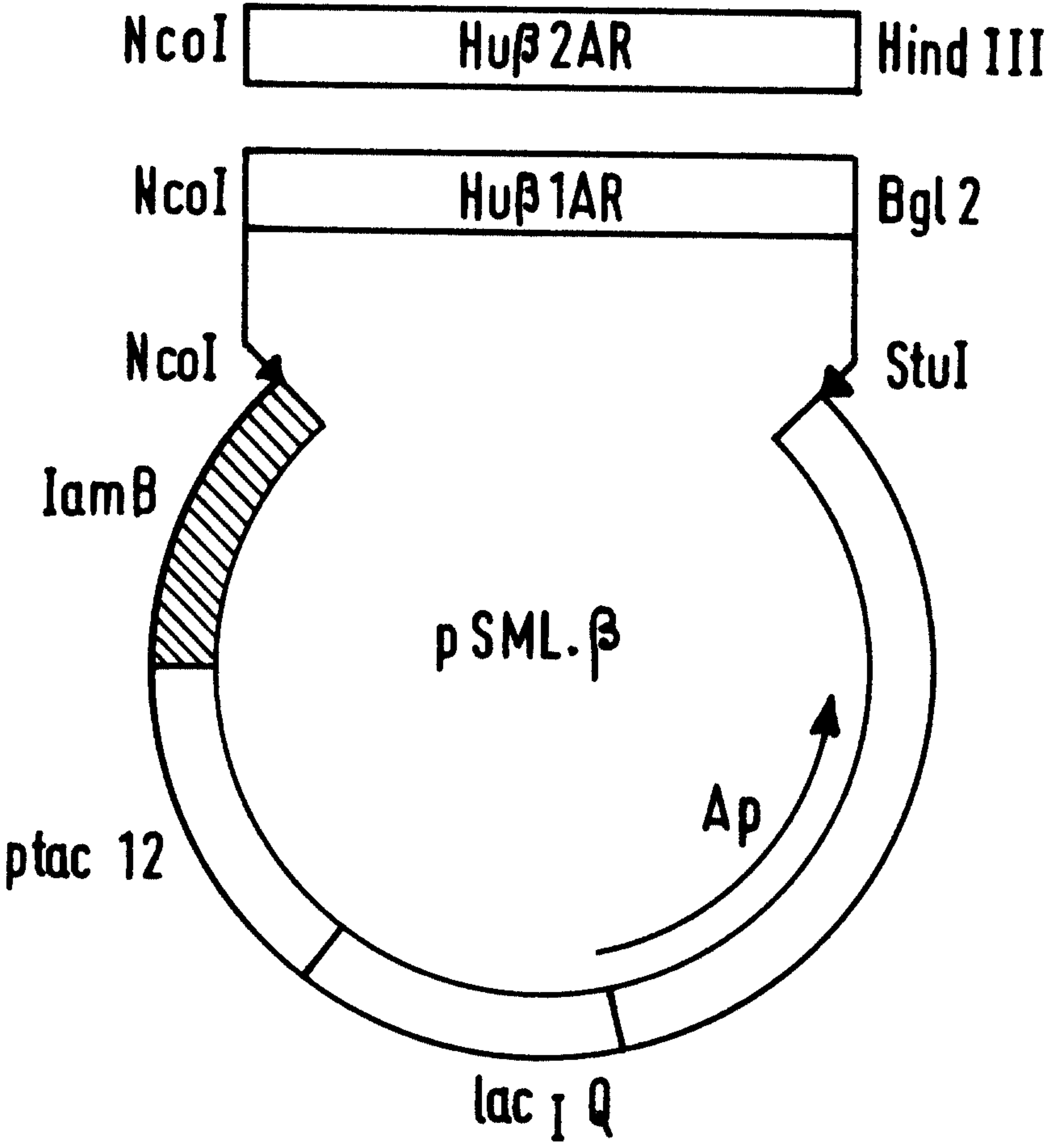


FIG.4

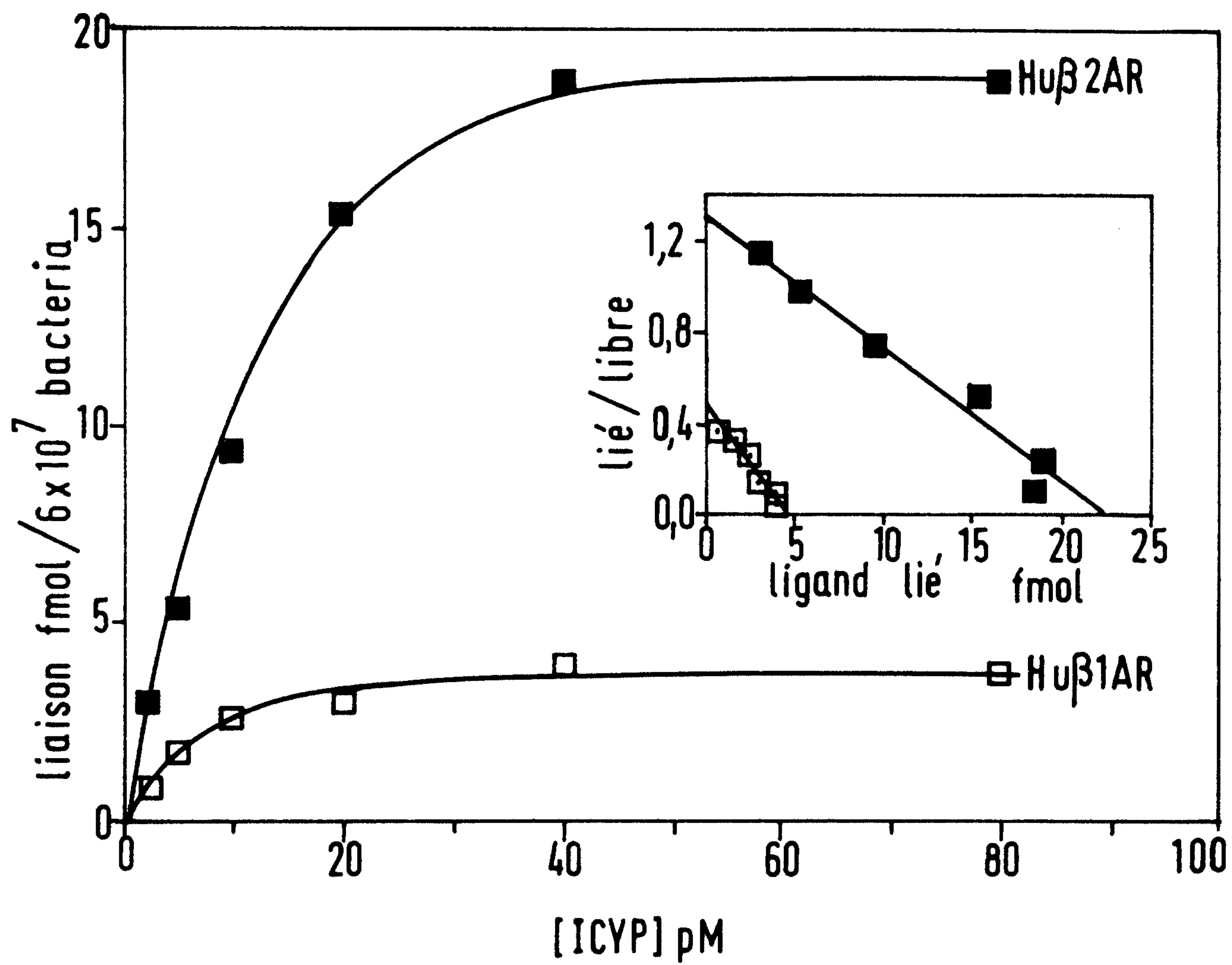


FIG. 5A

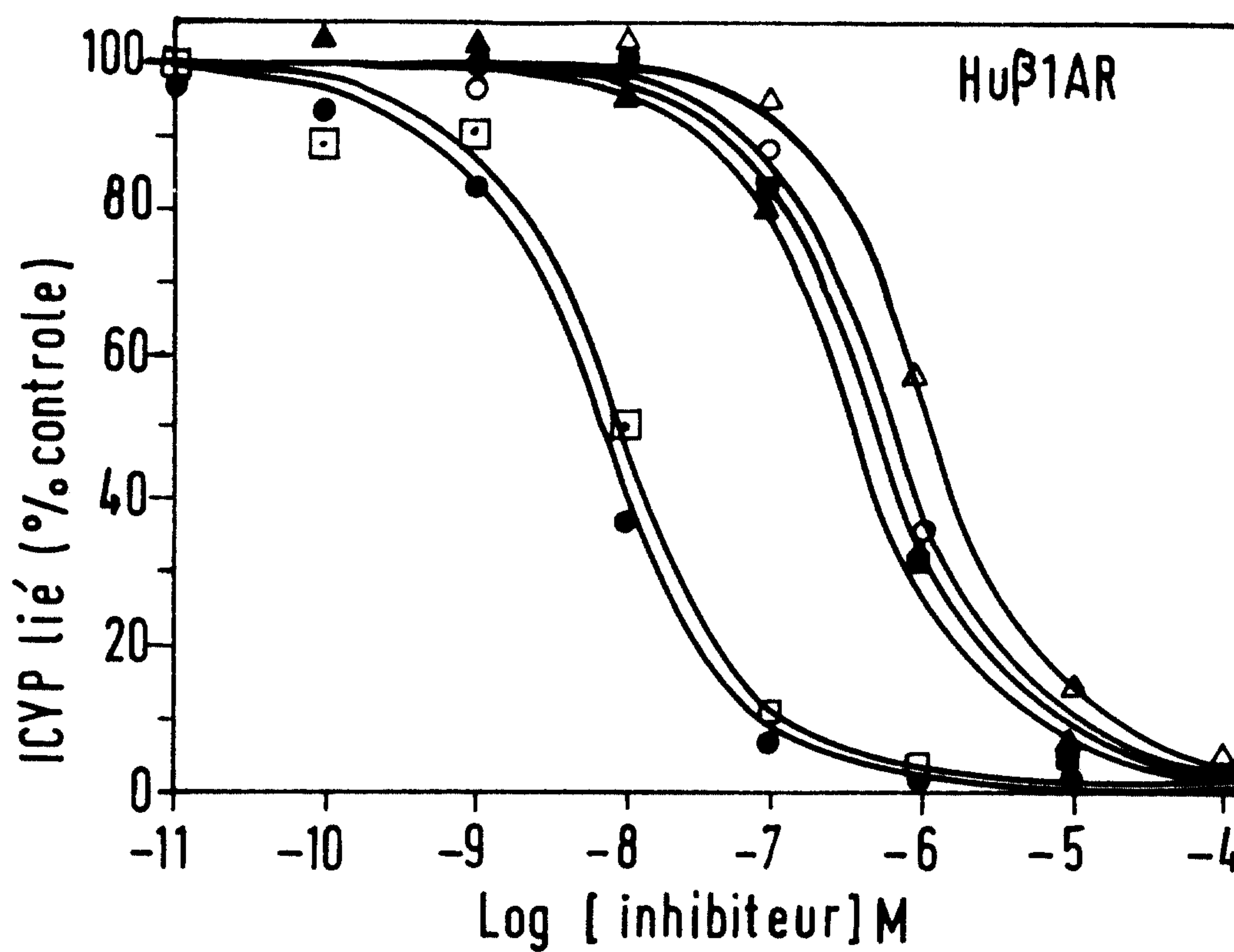


FIG.5B

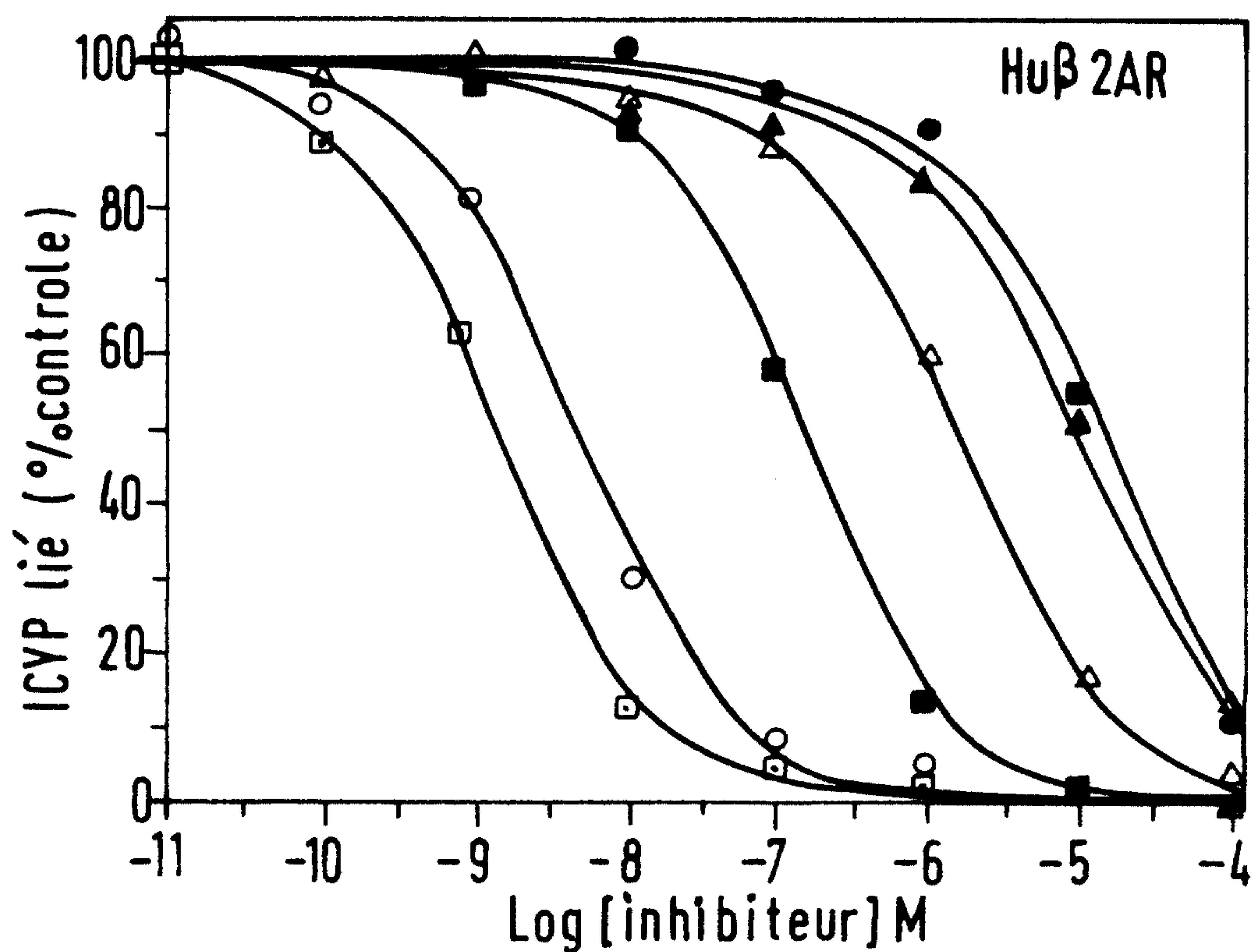


FIG.5C

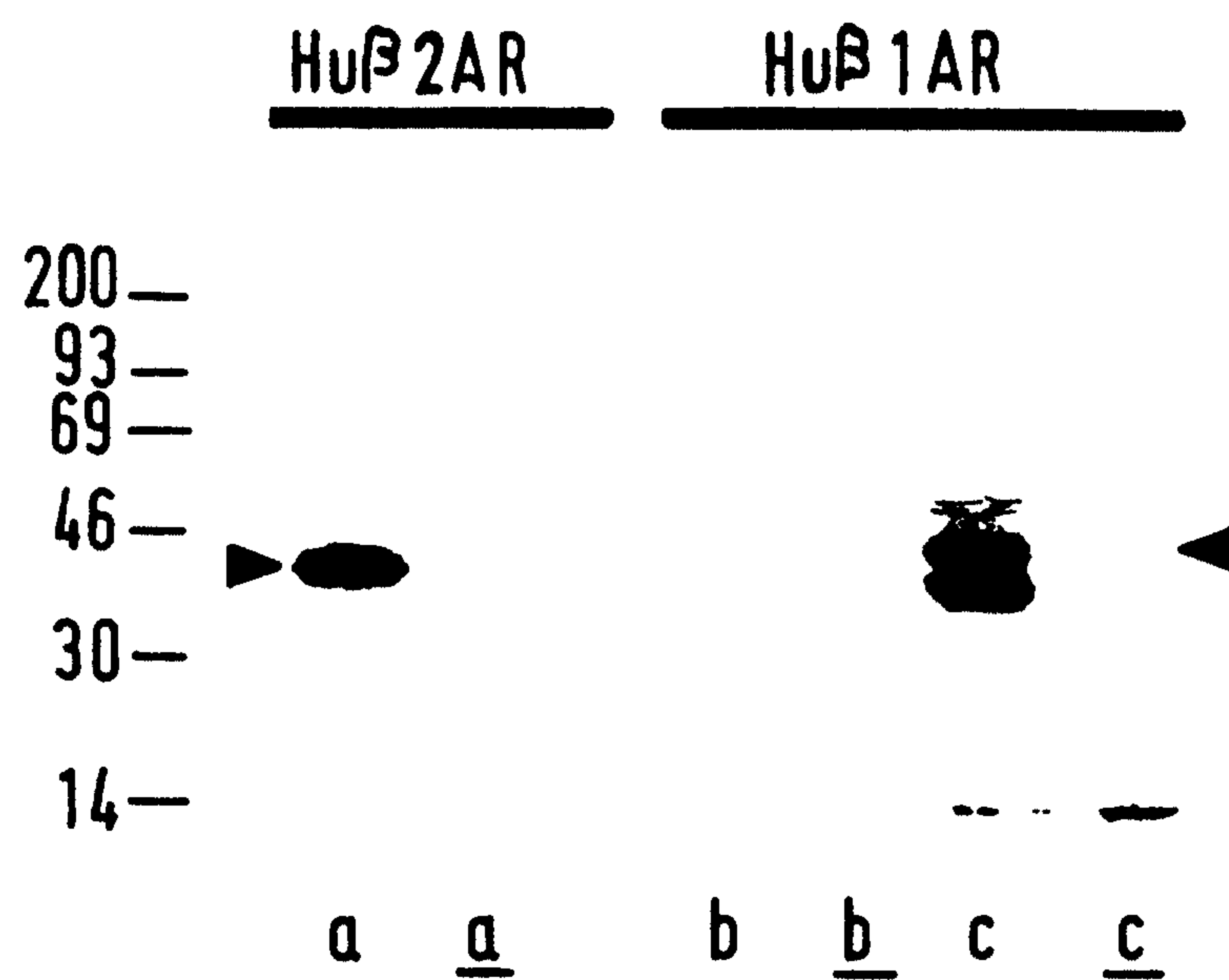


FIG. 6

clones E.coli exprimant les récepteurs

R1 R2 R3 R4 Rn

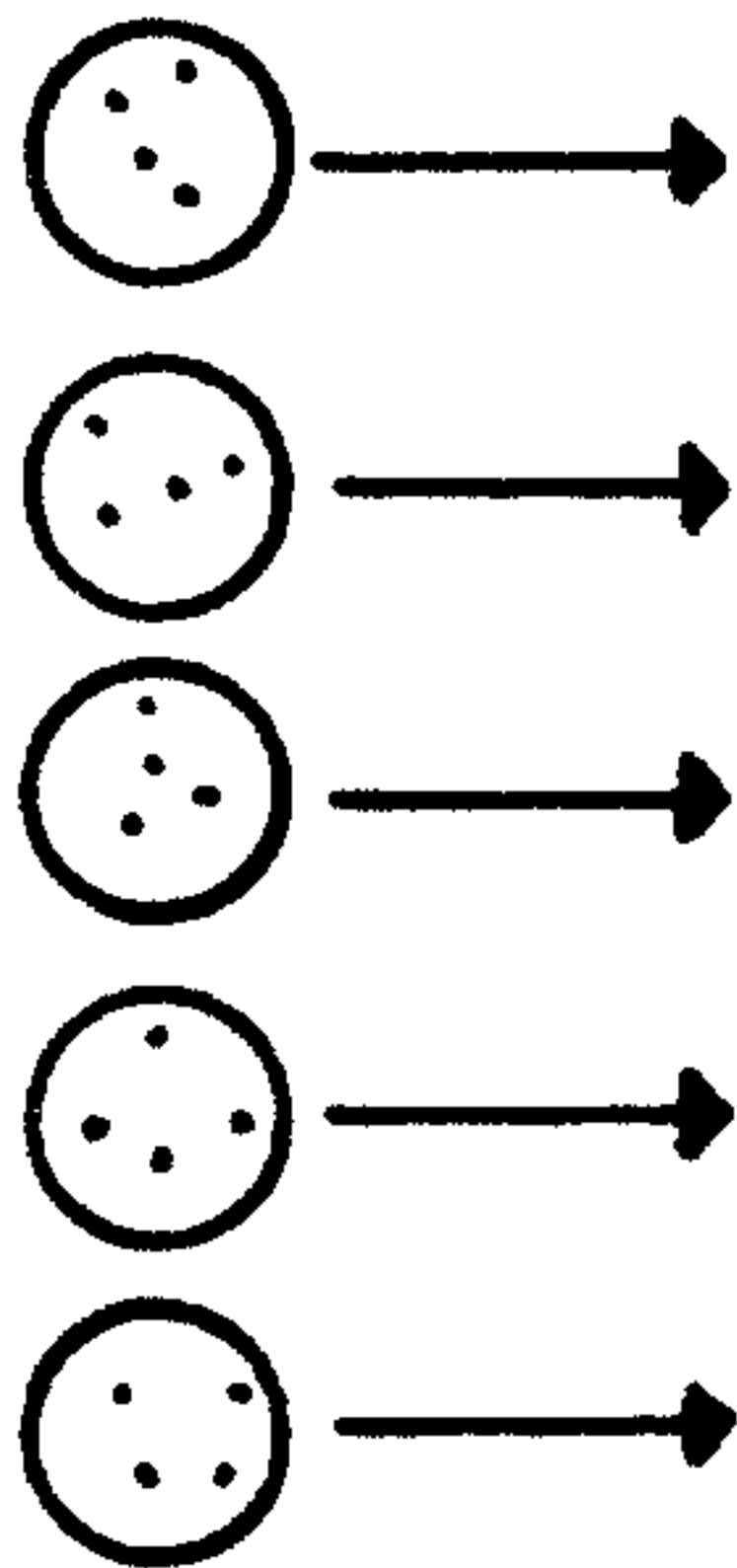
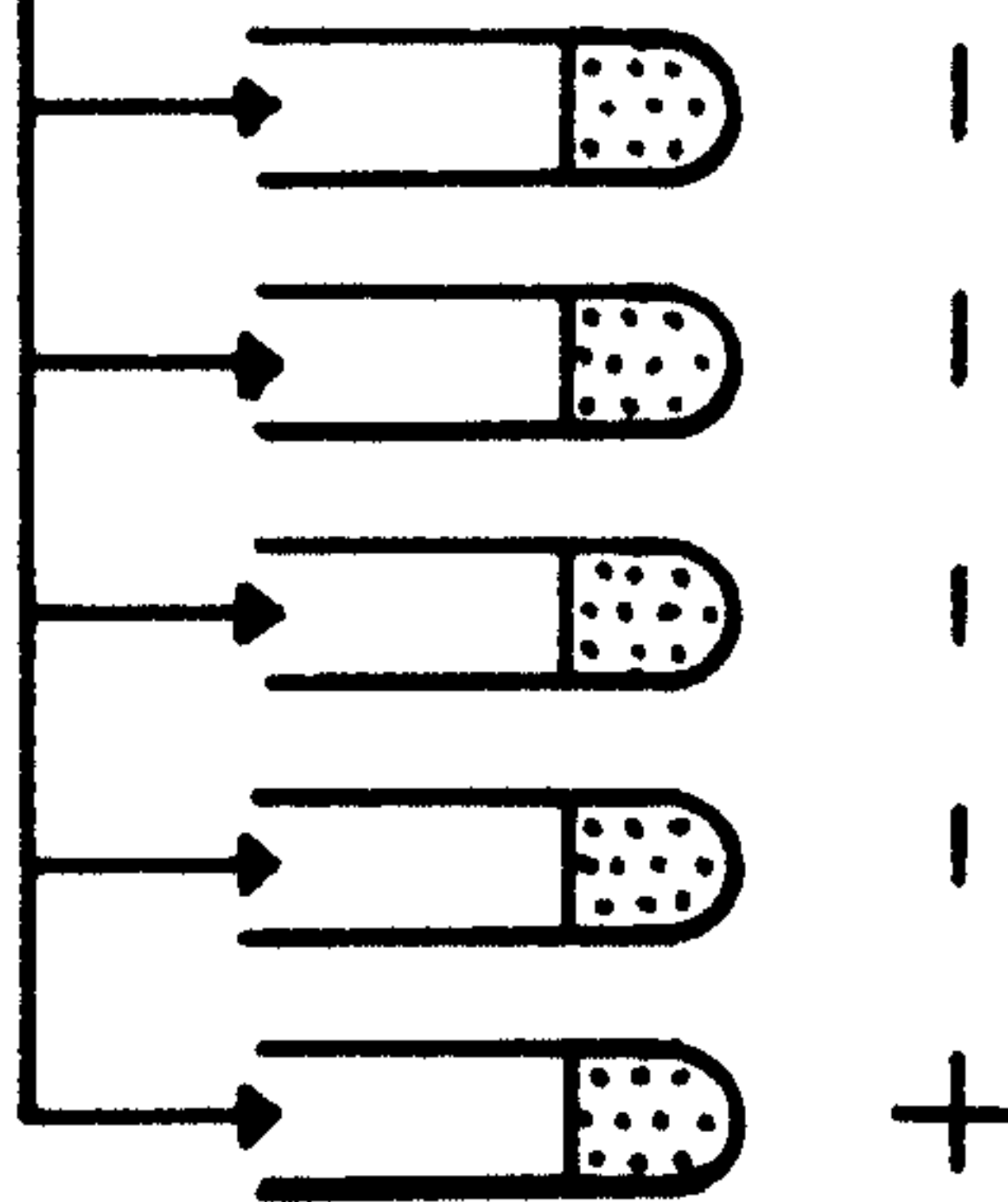


FIG. 7

COMPOSE DE
SELECTIVITE
INCONNUE



ETAPE 1:
CRIBLAGE PAR TEST
D'INHIBITION DE
LIAISON

ETAPE 2:
ETUDE DE L'EFFET PHARMACO
LOGIQUE SUR DES CELLULES
DE MAMMIFERES PORTANT RI.

