

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 750 825**

②1 N° d'enregistrement national : **96 08810**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : A 01 K 67/027, C 12 N 5/10, 15/12

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 15.07.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 16.01.98 Bulletin 98/03.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *KIEFFER BRIGITTE, MATTHES HANS, SIMONIN FREDERIC HERVE, DIERICH ANDREE et LEMEUR MARIANNE.*

⑦3 Titulaire(s) : .

⑦4 Mandataire : *GROSSET FOURNIER ET DEMACHY SARL.*

⑤4 **ANIMAL TRANSGENIQUE NON HUMAIN DANS LEQUEL L'EXPRESSION DE L'UN AU MOINS DES GENES CODANT POUR LES RECEPTEURS AUX OPIACES EST MODIFIEE.**

⑤7 L'invention concerne l'utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain dont l'expression du gène codant pour un récepteur aux opiacés est modifiée, notamment dans les tissus nerveux par rapport à une expression normale, notamment dans les tissus nerveux, pour la détermination d'un médicament actif sur les pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés, notamment les douleurs sévères aiguës ou chroniques, la toxicomanie, ou la prévention ou le traitement des rejets de greffe.

**FR 2 750 825 - A1**



ANIMAL TRANSGENIQUE NON HUMAIN DANS LEQUEL  
L'EXPRESSION DE L'UN AU MOINS DES GENES CODANT POUR LES  
RECEPTEURS AUX OPIACES EST MODIFIEE

5 L'invention a pour objet un animal transgénique non humain dans lequel  
l'expression de l'un au moins des gènes codant pour les récepteurs aux opiacés  
est modifiée.

Les opiacés - dont le prototype est la morphine - sont les analgésiques les  
plus puissants dont dispose la médecine aujourd'hui. Leur utilisation est  
10 toutefois limitée par un ensemble d'effets secondaires dont les effets sur les  
fonctions autonomes (constipation, dépression respiratoire, hypotension,  
diurèse) et les effets psychotropes.

L'ensemble des actions des opiacés est médiée par des récepteurs  
membranaires du système nerveux qui reconnaissent et fixent spécifiquement  
15 ces composés. Il y a 20 ans ces récepteurs ont été mis en évidence par des  
études pharmacologiques. Trois récepteurs ont été identifiés : les récepteurs  
mu, delta et kappa. Il existe aujourd'hui des ligands sélectifs des 3 classes de  
récepteurs et l'étude de l'action de ces composés suggère :

- que le récepteur mu constitue la cible privilégiée de la morphine-opiacé  
20 prototypique et qui est l'analgésique le plus utilisé pour le traitement de  
douleurs sévères,

- le récepteur mu constitue également la cible principale de l'héroïne -  
l'un des narcotiques les plus redoutés dans le contexte de la toxicomanie,

- le récepteur delta serait également impliqué dans le contrôle de la  
25 douleur et l'état affectif (bien-être), mais dans une moindre mesure,

- le récepteur kappa, comme les deux autres récepteurs, jouerait un rôle  
dans l'action analgésique des opiacés. Par contre, et contrairement à mu et  
delta, il aurait une action psychotrope dysphorisante, action qui a été  
30 considérée comme un avantage pour la mise au point d'analgésiques puissants  
dépourvus de potentiel toxicomanogène.

Toutes les stratégies élaborées depuis 20 ans par les industries  
pharmaceutiques pour la mise au point d'un analgésique idéal sont basées sur  
ces données pharmacologiques. Celles-ci comprennent l'analyse *in vitro* et *in*  
*vivo* de l'effet d'agonistes ou d'antagonistes opiacés. L'interprétation des  
35 résultats est tributaire de la sélectivité mu/delta/kappa des produits étudiés et  
de leurs propriétés pharmacocinétiques pour les études *in vivo*.

Un ensemble de résultats pharmacologiques semble indiquer l'existence  
de plusieurs récepteurs dans chacune des classes mu, delta ou kappa et qui

pourraient constituer des cibles distinctes pour les agonistes de chacune des classes de récepteurs. La question de savoir s'il existe trois récepteurs seulement ou plusieurs récepteurs mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ) et kappa ( $\kappa$ ) n'est pas résolue aujourd'hui.

5 Trois gènes codant pour ces récepteurs ont été clonés très récemment. Chacun d'eux correspond à l'une des classes de récepteurs précédemment définis par la pharmacologie. Ont donc été caractérisés au niveau moléculaire un gène mu, un gène delta et un gène kappa. L'implication de ces gènes dans l'action biologique des substances opiacées *in vivo* n'a pas été définie.

10 Les gènes codant pour les récepteurs aux opiacés ont été clonés très récemment (Kieffer B. (1995) Cellular and Molecular Neurobiology 15:615-635.).

Dans ce qui suit, on désigne par MOR, le gène du récepteur  $\mu$ , par DOR le gène du récepteur  $\delta$  et par KOR le gène du récepteur  $\kappa$ .

15 L'un des aspects de l'invention est de fournir un modèle expérimental permettant de cibler des médicaments présentant les propriétés d'analgésiques puissants, sans présenter les effets secondaires des opiacés du type morphine.

L'un des aspects de l'invention est de fournir des animaux mammifères transgéniques non humains dans lesquels l'un au moins des gènes des récepteurs aux opiacés n'est plus exprimé.

20 L'un des aspects de l'invention est de fournir des animaux mammifères transgéniques non humains dans lesquels le gène du récepteur  $\mu$  n'est plus exprimé.

L'un des aspects de l'invention est de fournir des animaux mammifères transgéniques non humains dans lesquels le gène du récepteur  $\delta$  n'est plus exprimé.

25 L'un des aspects de l'invention est de fournir des animaux mammifères transgéniques non humains dans lesquels le gène du récepteur  $\kappa$  n'est plus exprimé.

30 L'un des autres aspects de l'invention est de fournir un modèle animal susceptible de cribler des médicaments actifs sur des pathologies impliquant l'un au moins des récepteurs aux opiacés.

L'invention a pour objet l'utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain dont l'expression de l'un au moins des gènes codant pour les récepteurs aux opiacés est modifiée, notamment supprimée dans les  
35 tissus ou cellules du cerveau, par rapport à une expression normale, notamment dans les tissus ou cellules du cerveau, pour la détermination d'un médicament actif sur les pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés.

Plus précisément, l'invention a pour objet l'utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain dont l'expression du gène codant pour un récepteur aux opiacés est modifiée, notamment dans les tissus nerveux par rapport à une expression normale, notamment dans les tissus nerveux, pour la  
5 détermination d'un médicament actif sur les pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés, notamment les douleurs sévères aiguës ou chroniques, la toxicomanie, ou la prévention ou le traitement des rejets de greffe.

Le terme "mammifère" inclut tous les mammifères à l'exception des humains, avantageusement les rongeurs et notamment les souris.

10 Par "animal transgénique", on désigne non seulement un animal dans le génome duquel on a introduit un gène exogène, mais également un animal dans lequel on a délété l'expression d'un gène endogène, soit par interruption du gène endogène, soit par remplacement d'un gène endogène ou d'un fragment de celui-ci par une construction telle qu'elle ne permette plus l'expression du  
15 gène endogène. On désignera de tels animaux par animaux "knock-out" ou déficients en susdit gène endogène.

L'expression normale de l'un des récepteurs aux opiacés peut être définie par plusieurs méthodes:

20 1) Détermination de l'ARNm correspondant à l'un des gènes des récepteurs aux opiacés : ceci est possible par la technique de transfert d'ARN (Northern blot) dans laquelle les ARNm sont séparés sur gel d'agarose dénaturant par électrophorèse, puis les ARN sont transférés et fixés sur une membrane de type nitrocellulose ou Nylon. Pour révéler la présence des ARN correspondant à l'un des gènes des récepteurs aux opiacés, on peut utiliser une  
25 sonde correspondant à la totalité ou à un fragment de l'ADNc du gène en question.

30 2) Détermination de la quantité de protéine correspondant à l'un des récepteurs aux opiacés : ceci est possible en étudiant la liaison d'un ligand opiacé (agoniste ou antagoniste) tel que diprénorphine non sélectif vis-à-vis des récepteurs opiacés, DAGO (sélectif vis-à-vis de  $\mu$ ), naltrindole (sélectif vis-à-vis de  $\delta$ ) et CI977 (sélectif vis-à-vis de  $\kappa$ ) marquée, aux récepteurs présents dans un homogénat de tissu (cerveau). S'agissant des définitions respectives de ces ligands, elles sont indiquées dans la légende de la figure 2. En particulier, la constante de dissociation  $K_d$  de plusieurs ligands  
35 spécifiques de l'un des récepteurs aux opiacés est connue et est de l'ordre de 1 nanomolaire pour les ligands généralement utilisés. On sait, par ailleurs, que le  $B_{max}$  pour les ligands ci-dessus est de l'ordre de 0.1 picomole/mg de protéine membranaire pour les récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  et 0,02 picomoles/mg de

protéine membranaire pour le récepteur  $\kappa$  s'agissant du cerveau de souris. On sait donc qu'une courbe de saturation avec ce ligand sur des extraits de membranes contenant les trois récepteurs aux opiacés préparés à partir de cerveau et l'analyse par la méthode de Scatchard (détermination du nombre de sites du récepteur) des résultats obtenus à partir des courbes de saturation, doit donner des valeurs d'affinité de  $B_{max}$  divisé par deux chez des hétérozygotes et des valeurs de  $B_{max}$  nulles (non mesurables) chez des homozygotes.

Ceci permet donc de quantifier la quantité correspondant à l'un des récepteurs aux opiacés.

Selon un mode de réalisation, l'invention concerne l'utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain qui n'exprime plus le gène du récepteur  $\mu$ , ou du récepteur  $\kappa$  ou du récepteur  $\delta$ .

La modification et l'absence d'expression de l'un de ces gènes peut être déterminée de la façon suivante.

1) Des souris où le gène du récepteur aux opiacés a été modifié de telle sorte qu'il ne puisse plus être exprimé sont d'abord caractérisées relativement à l'ADN par analyse avec la méthode de transfert d'ADN (Southern blot), à l'aide d'une sonde consistant en un fragment contenant tout ou partie de la région du récepteur aux opiacés, cette sonde étant définie dans les exemples.

L'hybridation de cette sonde montre clairement que la bande correspondant à l'un des récepteurs aux opiacés de type sauvage (c'est-à-dire normalement présent chez les animaux) n'est plus présente dans les animaux homozygotes vis-à-vis de la mutation, mais remplacée par une bande correspondant au génome modifié.

2) L'analyse par transfert d'ARN (Northern blot) des ARN extraits des tissus exprimant l'un des récepteurs aux opiacés, notamment cerveau, montre qu'il n'y a plus d'expression d'ARN correspondant au gène sauvage. La sonde utilisée dans ce cas est définie par la portion d'ADN complémentaire codant pour le récepteur opiacé  $\mu$  de souris en aval du site BamH I unique de la région codante jusqu'au codon STOP.

3) Enfin on peut démontrer aussi que la liaison de ligands spécifiques à l'un des récepteurs aux opiacés, notamment à l'aide des ligands DAGO (sélectif vis-à-vis de  $\mu$ ), naltrindole (sélectif vis-à-vis de  $\delta$ ) ou CI977 (sélectif vis-à-vis de  $\kappa$ ), est complètement absente dans ces souris.

Les tissus dans lesquels l'expression d'un gène codant pour un récepteur opiacé est modifiée sont essentiellement les tissus nerveux et en particulier les cellules neuronales.

Dans le cadre de l'invention, on n'exclut pas la modification de l'expression du susdit gène dans d'autres types de cellules, telles que les cellules immunitaires.

Concernant les pathologies douloureuses traitées par les opiacés  
5 concernés par l'invention on peut citer ;

1. douleurs aiguës ou chroniques : douleurs par excès de nociception avec lésions tissulaires, incluant les douleurs cancéreuses, les douleurs postopératoires, les douleurs infectieuses et les douleurs chroniques de type rhumatismes inflammatoires et rhumatismes inflammatoires dégénératifs,

10 2. douleurs chroniques : douleurs par lésion du système nerveux ou douleurs neuropathiques comprenant (1) les déafférentations (exemple : amputation) et les déafférentations avec nociception (exemple : lombosciatalgie résiduelle postopératoire).

Par ailleurs, les antagonistes opiacés peuvent avoir des propriétés  
15 immuno-suppressives qui peuvent être mises à profit dans la prévention ou le traitement des greffes, mais le mécanisme de cette action biologique n'est pas connu.

A cet égard, le natrindole a un effet suppressif sur la réaction mixte lymphocytaire (Mixed lymphocyte reaction, MLR en anglais) *in vitro* et empêche le rejet de greffe *in vivo* (Arakawa, K., Akami, T., Okamoto, M., Nakai, I., Oka, T., Nagase, H. Transplantation proceedings (1993) 25:738-740). Les protocoles expérimentaux concernant l'étude du rejet de greffe se trouvent dans cette référence. Les souris transgéniques de l'invention permettent d'évaluer la composante mu (vs delta et kappa) dans la réponse des  
25 souris aux drogues en développement, par exemple des composés dérivés du natrindole (antagoniste delta) pour la mise au point d'un agent bloquant le rejet de greffe.

Il a été montré par ailleurs que les alcaloïdes opiacés ont une activité immunosuppressive sur d'autres fonctions immunitaires: ils bloquent/inhibent  
30 la production d'anticorps et l'activité tueuse ("Natural Killer"), deux composantes essentielles des réponses immunitaires contre les infections. Les souris délétées pour l'expression des récepteurs opioïdes seront donc également utilisées en tant que modèle animal pour tester l'action des drogues immunosuppressives de types opiacées mises au point pour l'application ci-dessus, pour toutes les composantes de la réponse immunitaire.

35 Dans ce qui précède et ce qui suit, par "gènes  $\mu$  du récepteur aux opiacés", on désigne également les isoformes générées par épissage alternatif qui se situent au niveau de la jonction spécifique au gène mu (entre exon 3 et

4) : Zimprich, A., Simon, T. and Höllt, V. (1995) Cloning and expression of an isoform of the rat  $\mu$ -opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist-induced desensitization from RMOR1. FEBS 359:142-146 and Bare, L.A., Mansson, E. and Yang, D.M. (1994) Expression of two variants of the human  $\mu$ -opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. FEBS 354:213-216.

L'invention concerne également l'utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain tel que décrit ci-dessus qui n'exprime plus l'un au moins des récepteurs suivants : le récepteur aux opiacés de type mu, le récepteur aux opiacés de type kappa et le récepteur aux opiacés de type delta.

L'invention concerne également un animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 2 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

- soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase-1 (PGK-1), l'expression du gène de type mu étant supprimée.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'animal mammifère transgénique ou les cellules de mammifère dans lequel le gène  $\mu$  n'est plus exprimé sont tels qu'il y a interruption du gène  $\mu$ , notamment d'un exon et en particulier de l'exon 2, par insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase-1 (PGK-1), l'expression du gène de type mu étant supprimée.

L'invention concerne également un animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type delta, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 1 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

- soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du

promoteur phosphoglycérate kinase -1 (PGK-1), l'expression du gène de type delta étant supprimée.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'animal mammifère transgénique ou les cellules de mammifère dans lequel le gène delta n'est plus exprimé sont tels qu'il y a remplacement d'un fragment du gène  $\delta$  contenant un exon, notamment l'exon 1 par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié.

L'invention a également pour objet un animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 1 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

- soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase -1 (PGK-1), l'expression du gène kappa étant supprimée.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'animal mammifère transgénique ou les cellules de mammifère dans lequel le gène kappa n'est plus exprimé sont tels qu'il y a remplacement d'un fragment du gène  $\kappa$  contenant un exon, notamment l'exon 1 par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié.

L'invention concerne également des cellules cultivées à partir des animaux mammifères transgéniques non humains décrits ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne des cultures cellulaires contenant l'une des susdites constructions transgéniques.

Ces cultures cellulaires peuvent être obtenues soit à partir de cellules prélevées sur des animaux transgéniques tels que définis ci-dessus ou soit à partir de lignées cellulaires en utilisant les susdites constructions transgéniques, cette deuxième possibilité pouvant être effectuée à l'aide de techniques standard de transfection cellulaire.

L'invention concerne également un mammifère transgénique non humain tel qu'obtenu par introduction dans un blastocyte de cellules souches embryonnaires (cellules ES) comportant dans leur génome l'une des susdites constructions transgéniques, obtenue par recombinaison homologue, sélection d'animaux chimères mâles selon un critère correspondant à la lignée ES, croisement des animaux sélectionnés avec des souris, notamment des souris



C57 Black 6, pour obtenir des animaux hétérozygotes par rapport à l'une des susdites constructions et éventuellement croisement de deux hétérozygotes pour obtenir un animal homozygote par rapport à l'une des susdites constructions.

5 L'homozygote présente un fond génétique 129/C57 Black 6 50/50. On peut revenir sur un fond génétique C57 Black 6 par croisement homozygote avec des souris C57 Black 6 sur 12 générations au moins.

On choisit de façon avantageuse les souris C57 Black 6, car ce fond génétique est plus favorable pour certaines expériences de comportement.

10 L'invention concerne également un mammifère transgénique tel que produit par croisement d'animaux transgéniques exprimant l'une des constructions transgéniques définies ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé d'obtention d'un modèle transgénique pour l'étude des pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés de type mu, ou les récepteurs aux opiacés de type delta ou les récepteurs aux opiacés de type kappa, et de leur traitement, comprenant

15 - le remplacement du gène endogène du récepteur aux opiacés de type  $\mu$ , ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type delta ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans des cellules, notamment embryonnaires souches de souris (ES), cellules par une construction comprenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

25 \* l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

30 \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

35 \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,

et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion de la cassette PGK-neo,

5 ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,

10 ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo,

et

- l'introduction des susdites cellules dans des embryons, notamment des blastocytes de mammifères non humains,

15 - la sélection d'animaux chimères mâles selon un critère correspondant à la lignée ES,

- le croisement des animaux sélectionnés avec des souris, notamment des souris C57BL/6, pour obtenir des animaux hétérozygotes par rapport à l'une des constructions selon l'invention et

20 - éventuellement le croisement de deux hétérozygotes pour obtenir un animal homozygote par rapport à l'une des constructions selon l'invention.

Le critère utilisé est par exemple la couleur des poils (Agouti).

L'invention concerne un procédé de criblage de médicaments actifs sur des pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés, notamment les pathologies suivantes : douleurs sévères aiguës ou chroniques, toxicomanie, 25 prévention ou traitement de rejet de greffes, comprenant :

- l'administration à un mammifère non humain transgénique ou à des cellules de mammifères non humains transgéniques contenant à la place du gène endogène du récepteur aux opiacés de type mu, ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type delta, ou du gène endogène du récepteur aux 30 opiacés de type kappa, une construction contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

35 \* l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

- \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou
- 5 \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,
- 10 et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion de la cassette neo,
- ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,
- 15 ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo ;
- la détermination des seuils nociceptifs par le test de l'immersion de la queue et de la plaque chaude après injection des drogues à tester,
  - 20 - la détermination de la réponse aux drogues à tester pour les animaux dans lesquels on a produit une douleur chronique induite par l'injection de produits irritants, carrhagénane et adjuvant de Freund et produisant des monoarthrites ou polyarthrites ou le test de section du nerf sciatique ou le test
  - 25 de ligature du nerf sciatique dans le cas de douleurs neuropathiques,
  - ou la détermination des propriétés psychotropes des drogues à tester par les tests de préférence de place ou d'auto-administration, ou la détermination du niveau de dépendance physique par l'induction d'une dépendance sévère et la provocation d'un sevrage dans le cas de la
  - 30 toxicomanie,
  - ou la détermination de la réaction mixte lymphocytaire et de la durée de vie des greffons (Arakawa, K., Akami, T., Okamoto, M., Nakai, I., Oka, T., Nagase, H. Transplantation proceedings (1993) 25:738-740) dans le cas de la prévention ou du traitement du rejet de greffes.
- 35 L'invention concerne également une construction transgénique contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

- l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

5 - un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

10 - un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,

et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion de la cassette neo,

15 ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,

ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo.

20

Description des figures :

- Figure 1 :

Interruption du gène du récepteur opioïde  $\mu$ .

25 a) Stratégie de préparation des souris n'exprimant plus le gène  $\mu$ .  
L'organisation génomique et les cartes de restriction sont représentées de la façon suivante : pour la construction (sommet), gène sauvage (milieu) et gène recombinant (bas). Les boîtes noires représentent les régions codantes et la boîte blanche représente le gène Néo. La ligne renforcée indique la sonde en 5' utilisée pour identifier les événements de recombinaison homologue.  
30 E, exon; Néo, gène de résistance à la néomycine ; sites de restriction : B, BamH I ; S, Sal I ; Sp, Spe I.

35 b) Analyse génomique par transfert d'ADN (Southern blot) réalisé avec de l'ADN digéré par BamH I à partir de cellules ES électroporées, en utilisant la sonde 5'. Les fragments du gène sauvage et du gène recombinant sont respectivement de 6,3 kb et 7,6 kb.

c) Analyse génomique par transfert d'ADN (Southern blot) réalisé avec de l'ADN de queues de souris. Les souris hétérozygotes sont croisées, l'ADN génomique de leur progéniture est soumis à une digestion par BamH I et

analysé en utilisant la sonde 5'. Les génotypes sont décrits au-dessus de chaque bande : +/+, sauvage; +/-, hétérozygote; -/- homozygote.

- Figure 2 :

5 Analyse des sites de liaison des récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  dans les cerveaux de souris sauvages +/+, hétérozygotes +/- et homozygotes -/- déficients en gène du récepteur  $\mu$ .

a) Une analyse de Scatchard vis-à-vis de la liaison avec [ $^3$ H] DAGO ( $\mu$ ), [ $^3$ H] NTI ( $\delta$ ) et [ $^3$ H] CI977 ( $\kappa$ ) est représentée pour chaque génotype de souris. Un essai représentatif est montré. Les valeurs de Bmax et de Kd ( $\pm$  SEM = écart type moyen) à partir d'au moins trois expériences distinctes sont indiquées.

	Kd	Bmax	Kd	Bmax	Kd	Bmax
15 ○ +/+	1.343 (0.104)	0.099 (0.005)	0.068 (0.005)	0.095 (0.010)	0.214 (0.019)	0.019 (0.001)
20 $\Delta$ +/-	1.133 (0.105)	0.040 (0.004)	0.075 (0.011)	0.103 (0.010)	0.198 (0.025)	0.021 (0.003)
■ -/-	und	und	0.082 (0.014)	0.124 (0.008)	0.211 (0.025)	0.022 (0.002)

und = indétectable

25 b) Autoradiogrammes colorés par ordinateur des sections coronaires de cerveaux de souris coupés au niveau du caudate putamen. Les panneaux supérieurs montrent les récepteurs  $\mu$  marqués avec [ $^3$ H] DAGO, les panneaux du milieu montrent les récepteurs  $\delta$  marqués avec [ $^3$ H] DELTI et les panneaux inférieurs montrent les récepteurs  $\kappa$  marqués avec [ $^3$ H] CI977. La liaison est exprimée en fmol/mg de section de tissu et la liaison spécifique est > 85% pour le marquage de  $\mu$  et  $\delta$  et > 75% pour le marquage de  $\kappa$ . Les souris sauvages, hétérozygotes et homozygotes sont traitées en parallèle pour la liaison et pour le développement des autoradiogrammes.

35 c) Comme dans b), à l'exception du fait que les sections coronaires sont montrées au niveau de l'hippocampe.

#### METHODES.

Pour l'analyse de saturation, la liaison est effectuée en utilisant des protéines de membranes de cerveau entier (Ilien *et al.* Biochemical Pharmacology (1988). 37:3843-3851) à raison de 100  $\mu$ g incubées dans  
40 Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM 25°C pendant 1 h avec [ $^3$ H] DAGO (Amersham), [ $^3$ H] NTI (don de A. Borsodi) ou [ $^3$ H] CI977 (Amersham) en

utilisant des domaines de concentration de 0.05-6,4 nM, 0.005-0.64 nM et 0.01-1.28 nM respectivement. De la naloxone (Sigma) est utilisée à une concentration de 2  $\mu$ M pour déterminer la liaison non spécifique. Les expériences sont réalisées en triple en utilisant au moins deux préparations de membranes distinctes, chacune faite à partir de trois cerveaux. Les données de liaison sont analysées en utilisant le programme EBDA-LIGAND (Biosoft). Pour la cartographie par autoradiographie, les souris sont tuées par décapitation et les cerveaux intacts enlevés et immédiatement congelés dans l'isopentane à -20°C. Des sections coronaires gelées de 20  $\mu$ m sont coupées dans un cryostat (Zeiss Microm 505E) et sont montées en étant dégelées sur des lamelles pour microscope pré-traitées avec de la gélatine et séchées en utilisant CaSO<sub>4</sub> anhydre pendant 1 semaine à -20°C. Un ensemble additionnel de sections est coupé de façon adjacente à celles-ci pour la détermination de liaisons non spécifiques qui est déterminée pour tous les ligands avec la naloxone (1  $\mu$ M pour DAGO, CI-977 et 10  $\mu$ M pour DELT I). Des lamelles sont préincubées dans Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, plus 0.9% NaCl pendant 30 minutes pour éliminer les opioïdes endogènes. Une concentration d'environ 3 à 4 fois les K<sub>d</sub> est utilisée pour le marquage des récepteurs ([<sup>3</sup>H] DAGO, 4 nM; [<sup>3</sup>H] DELT I, 7 nM; [<sup>3</sup>H] CI977, 2.5 nM). La liaison est effectuée dans Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (1 ml pour chaque lamelle) à température ambiante pendant 60 minutes pour tous les ligands, lavée trois fois avec du tampon Tris-HCl refroidi à 4°C (5 minutes), rapidement séché à l'air frais et dessiqué pendant 3 jours avant de l'apposer à des films autoradiographiques [<sup>3</sup>H]-Hyperfilm (Amersham) pour une période de trois semaines ( $\mu$  et  $\delta$ ) et quatre semaines. Toutes les lamelles des cerveaux +/+, +/- et -/- sont déposées sur le même film, développées (en utilisant 50% Kodak D19 developer, 3 minutes) et analysées en utilisant un analyseur d'image MCID (Imaging Research, Canada). Ligands : CI977 (enadoline ou (-)-(5b,7b,8a)-3,4-dichloro-N-méthyl-N[7-(1-pyrrolidiny)-1-oxaspiro[4,5]-dec-8-yl]benzo[b]furan-4-acétamide), DAGO, [<sup>3</sup>H]-D-Ala<sup>2</sup>MePhe<sup>4</sup>Gly-ol<sup>5</sup> enképhaline; DELT I, D-Ala<sup>2</sup>deltorphine I; NTI, naltrindole.

- Figure 3 :

Analyse de l'hybridation *in situ* de gènes de peptides opioïdes endogènes dans les cerveaux mutants et sauvages.

a) Les sections coronaires au niveau du striatum (PENK et PDYN, grossissement x15) et au niveau de l'hypothalamus (POMC, grossissement x40) des cerveaux +/+, +/- et -/- sont représentées sous l'illumination en

champ sombre avec le grain du signal apparaissant en blanc. Le marquage en utilisant les sondes d'ARN antisens de la proenképhaline (PENK) et de la prodynorphine (PDYN) est détecté dans le noyau accumbens (ACB), caudate putamen (CPU), le tubercule olfactif (OTU) et le cortex piriforme (PIR) et le marquage en utilisant la ribosonde antisense POMC est détecté dans le noyau arqué (AN).

b) Le fort grossissement (x100) des sections à travers l'hypothalamus et à travers la glande pituitaire de cerveaux de souris +/+ et -/- hybridés à la ribosonde antisens proopiomélanocortine (POMC) est photographié sous illumination en champ clair (les grains du signal apparaissent comme taches noires). Les cellules contenant le transcript POMC sont représentées dans le noyau arqué et le marquage du lobe intermédiaire (IL) de la glande pituitaire est aussi représenté.

#### METHODES.

Des sections (10  $\mu$ M) sont préparées au cryostat à partir de cerveaux congelés et hybridées avec des ribosondes antisens spécifiques marquées au  $^{35}$ S comme décrit (Decimo *et al.*, (1995) In situ hybridization of nucleic acid probes to cellular RNA. In Gene Probes 2, A practical approach, Ed. Hames B.D. et Hiddins S., 183-210 Oxford University Press, Oxford). La sonde PENK est synthétisée à partir d'un fragment d'ADNc de 800 pb Pvu II-Xba I clonée dans pBluescript, la sonde PDYN à partir d'un fragment de restriction de 1700 pb Pst I-EcoR I sous-cloné dans pSP64 et la sonde POMC à partir d'un fragment de 400 pb Not I-Nco I cloné dans pBluescript. Les ADNcs sont un don de E. Borrelli. Les ribosondes sont synthétisées en parallèle, les cerveaux des trois génotypes sont traités et hybridés dans la même série d'expériences, et exposés sous émulsion Kodak NTB-2 pendant la même période de temps.

#### - Figure 4 :

Activité locomotrice spontanée de souris mutantes dépourvues de récepteurs opioïdes  $\mu$  (-/-), et de leurs congénères de type sauvage (+/+). Les boîtes consistent en des surfaces rectangulaires plastique (25.5 cm x 20.5 cm) avec deux photocellules croisées, isolées dans un cadre insonorisé avec une illumination légère (lux). L'activité locomotrice est mesurée à 14 h pendant trois jours consécutifs. La mesure dure 15 minutes. Aux jours 5 et 6, l'activité locomotrice est enregistrée à 14 h et 2 h respectivement. Toutes les expériences sont faites par un observateur aveugle. Les valeurs sont analysées par le système statistique ANOVA. Les comparaisons individuelles sont faites

par le test de Dunnett. Le nombre d'animaux: 24 sauvages et 23 mutants. Les carrés noirs correspondent aux souris homozygotes et les carrés blancs correspondent aux souris sauvages. Les étoiles noires indiquent la comparaison à différents temps de mesure pour le même groupe d'animaux :

- 5           a. schéma de gauche : entre le premier et le troisième jour,  
          b. schéma de droit : entre 14 h et 2 h.

Les étoiles blanches montrent la comparaison entre les groupes sauvages et mutants au même moment de mesure (test de Dunnett bilatéral).

Une étoile correspond à  $p < 0.05$  et deux étoiles correspondent à  $p < 0.01$ .

10

- Figure 5 :

Réponses antinociceptives à l'administration de morphine dans les souris mutantes dépourvues de récepteur opioïde  $\mu$  (-/-) et leurs congénères de type sauvage (+/+). Pour évaluer la réponse à la douleur, on a effectué :

- 15           a) test de l'immersion de la queue ;  
          b) test de la plaque chaude.

Le test de l'immersion de la queue (54°C) et le test de la plaque chaude sont effectués 10 minutes et 20 minutes respectivement après injection de solution saline ou de morphine. Le temps maximal observé est de 15 secondes pour le test de l'immersion de la queue, et de 30 et 180 secondes respectivement pour la réponse au léchage et au saut dans le test de la plaque chaude. Les tests pharmacologiques et le soin aux animaux est fait selon les normes éthiques standard (NIH, 1985). Les valeurs sont analysées par ANOVA (mutation et traitement) entre les sujets. Les comparaisons individuelles sont faites par le test de Dunnett. Le nombre d'animaux par groupe est de 7 à 11.

Les carrés noirs correspondent aux souris homozygotes et les carrés blancs correspondent aux souris sauvages.

Les étoiles noires indiquent les comparaisons entre les animaux traités avec une solution saline (animaux témoins) du même génotype et les étoiles blanches montrent la comparaison entre les groupes sauvages et mutants qui reçoivent le même traitement (test de Dunnett bilatéral).

Une étoile correspond à  $p < 0.05$  et deux étoiles correspondent à  $p < 0.01$ .

35

- Figure 6 :

Pour évaluer le caractère euphorisant des drogues, on effectue le test de la place de préférence à la place conditionnée, induite par la morphine dans les



souris dépourvues de récepteur opioïde  $\mu$  (-/-), et leurs congénères de type sauvage (+/+). Le paradigme de la préférence de place est effectué en utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles données dans (Valverde *et al.*, 1996), à l'exception du temps de conditionnement (18 minutes) et de la taille des compartiments (15 cm x 15 cm x 15 cm). En bref, le schéma de conditionnement consiste en 3 phases. Pendant la phase de préconditionnement, les animaux sont placés sur une surface neutre et le temps passé dans chaque compartiment est enregistré. La phase de conditionnement consiste en 6 jours consécutifs de morphine (3 mg/kg, sous-cutanée) ou de solution saline. Les portes situées sur les murs des compartiments permettent de confiner les souris immédiatement après l'injection. Les souris reçoivent la morphine aux jours 1, 3 et 5, et la solution saline aux jours 2, 4 et 6. Les animaux témoins reçoivent la solution saline chaque jour. La phase de test est réalisée exactement comme la phase de préconditionnement (libre accès de chaque compartiment), 24 h après l'étape de conditionnement finale. Les données sont exprimées en résultats calculés comme différence entre le temps de postconditionnement et de préconditionnement passé dans le compartiment associé avec le médicament. Les valeurs sont analysées par ANOVA (mutation et traitement) entre les sujets. Le nombre d'animaux par groupe est de 9 à 14.

Les étoiles noires indiquent les comparaisons entre les animaux traités avec une solution saline (animaux témoins) du même génotype et les étoiles blanches montrent la comparaison entre les groupes sauvages et mutants qui reçoivent le même traitement (test de Student "t bilatéral).

Deux étoiles correspondent à  $p < 0.01$ .

25

- Figure 7 :

Incidence de l'abstinence mesurée pendant le syndrome de manque de morphine provoqué par la naloxone dans des souris mutantes dépourvues de récepteurs opioïdes  $\mu$  (-/-), et leurs congénères de type sauvage (+/+).

30 a) Signes somatiques. Les carrés noirs correspondent aux souris homozygotes et les carrés blancs correspondent aux souris sauvages.

b) Signes végétatifs.

Les résultats sont exprimés comme moyennes  $\pm$  SEM. La dépendance aux opiacés est induite dans les souris par des injections intrapéritonéales répétées de morphine, à intervalle de 12 heures pendant 6 jours. La dose de morphine est progressivement augmentée comme suit: premier jour, 20 mg/kg; deuxième jour: 40 mg/kg; troisième jour: 60 mg/kg; quatrième jour: 80 mg/kg; cinquième jour: 100 mg/kg; sixième jour (seulement une injection

35

le matin) 100 mg/kg. Les souris témoins sont traitées avec de la solution saline dans les mêmes conditions. Le manque est provoqué dans chaque animal en injectant de la naloxone (1 mg/kg, sous-cutanée) seulement une fois 2 heures après la dernière administration de morphine. Trente minutes avant l'injection de naloxone, les animaux sont placés individuellement dans des chambres de test consistant en des boîtes rondes transparentes (30 cm de diamètre x 50 cm de hauteur) avec un sol blanc. Pendant les 15 minutes précédant l'injection de naloxone, les souris sont observées afin de vérifier la présence d'un comportement normal. Les signes somatiques de manque sont évalués immédiatement après l'injection de l'antagoniste opiacé pendant une période de 30 minutes. Le nombre d'ébrouements, de sauts, de tremblements de la patte et de reniflage sont comptés. Le claquement de dents, les diarrhées, tremblements et ptôses sont évalués pendant des périodes de 5 minutes, un point pour la présence de chaque signe étant donné pendant chaque période. Le nombre de périodes montrant le signe est ensuite compté (score maximum : 6). Le poids corporel et la température rectale sont déterminés 2 minutes avant et 30 minutes après l'injection de naloxone. La température rectale est également mesurée 60 minutes après la naloxone. Voir légende de la figure 5 pour l'analyse statistique. Le nombre d'animaux par groupe va de 9 à 14.

Les carrés noirs correspondent aux témoins homozygotes ayant reçu une injection de solution saline. Les carrés blancs correspondent aux témoins sauvages ayant reçu une injection de solution saline.

Les carrés comportant des diagonales serrées correspondent aux témoins homozygotes ayant reçu une injection de morphine. Les carrés comportant des diagonales espacées correspondent aux témoins sauvages ayant reçu une injection de morphine.

Les étoiles noires indiquent les comparaisons entre les animaux traités avec une solution saline (animaux témoins) du même génotype et les étoiles blanches montrent la comparaison entre les groupes sauvages et mutants qui reçoivent le même traitement (test de Student "t bilatéral).

Une étoile correspond à  $p < 0.05$  et deux étoiles correspondent à  $p < 0.01$ .

- Figure 8 : Criblage ES : Interruption du gène mu par recombinaison homologue :

A. Représentation d'un fragment BamH I-BamH I (environ 14 kb) du gène mu de souris pour lequel la recombinaison homologue a eu lieu. Le gène néo avec son promoteur et son signal de polyadénylation sont insérés dans

l'exon 2 (nucléotides 6375 à 7989). La position des sondes externes 5' et 3', ainsi que la sonde néo est indiquée en gras sous le fragment de gène schématisé.

5 B. Taille des fragments attendus lors du criblage par Southern de l'ADN génomique de cellules ES. Digestion de l'ADN par BamH I et hybridation du Southern avec la sonde I (= sonde 5'). WT = fragment sauvage; Rec= fragment muté.

10 C. Taille des fragments attendus lors du criblage par Southern de l'ADN génomique de cellules ES. Digestion de l'ADN par BamH I et hybridation du Southern avec la sonde II (= sonde néo. WT = fragment sauvage; Rec= fragment muté.

15 D. Taille des fragments attendus lors du criblage par Southern de l'ADN génomique de cellules ES. Digestion de l'ADN par EcoR I + Nco I et hybridation du Southern avec la sonde III (= sonde 3'). WT = fragment sauvage; Rec= fragment muté.

Légende :

- le trait correspond au génome,
- le rectangle blanc correspond à l'intron mMOR,
- le rectangle noir correspond à l'exon mMOR,
- 20 - le rectangle comportant les diagonales espacées correspond au promoteur PGK,
- le rectangle comportant les diagonales serrées correspond au gène neo.

- Figure 9 : Construction  $\delta$

25 Interruption du gène delta par recombinaison homologue.

A. Carte de restriction d'un fragment Sac I-EcoR I d'environ 14.5 kb du gène delta de souris contenant l'exon 1 codant pour les acides aminés 1 à 77 du récepteur delta.

30 B. Portion du gène delta Sac I-EcoR I utilisé pour réaliser le vecteur de recombinaison homologue. Le fragment de 1.9 kb contenant le gène néo a été inséré dans les sites Sma I présents de part et d'autre de l'exon 1.

35 C. Résultat de la recombinaison homologue: la totalité de l'exon I est remplacée par le gène néo. La position des sondes 5' et 3' externes utilisées pour le criblage est indiquée sous forme de traits gras sous le fragment de gène schématisé. La sonde 5' (= sonde 1) correspond à un fragment Sac I-Sac I de 700 pb. La sonde 3' (= sonde 2) a été obtenue par PCR avec les oligos indiqués sur le schéma et a une taille de 300 pb.

Légende :

- les carrés comportant des diagonales correspondent au gène néo,
- les carrés comportant des losanges correspondent à l'exon 1.

A = ApaI            S = SacI  
 B = BamHI        Sal = SalI  
 E = EcoRI        Sc = Sca I  
 K = KpnI         Sm = SmaI  
 N = NotI         Sp = SpeI

- Figure 10 : Construction  $\kappa$  :

Interruption du gène kappa par recombinaison homologue.

10 A. Carte de restriction d'un fragment EcoR I-EcoR I d'environ 16 kb du gène kappa de souris contenant les exons 1 et 2 codant respectivement pour les acides aminés 1 à 86 et 87 à 102 du récepteur kappa. Les sites EcoR I, Sac I et BamH I sont présents naturellement dans le gène; les deux sites Sma I ont été créés par mutagenèse dirigée. Les tailles des fragments BamH I-BamH I et  
 15 EcoR I-EcoR I sont indiquées.

B. Portion du gène kappa BamH I-BamH I utilisé pour réaliser le vecteur de recombinaison homologue.

C. Résultat de la recombinaison homologue: la plus grande partie de l'exon I est remplacée par le gène néo. La position des sondes 5' et 3' externes  
 20 utilisées pour le criblage est indiquée sous forme de traits gras sous le fragment de gène schématisé.

### EXEMPLE 1 :

25 **Création d'une lignée de souris mutantes pour laquelle le gène codant pour le récepteur opioïde  $\mu$  n'est plus exprimé.**

Méthodes. Une banque génomique de souris dérivée de la souche 129/sv est criblée en utilisant une sonde d'ADNc du récepteur opioïde  $\delta$  de souris (Kieffer B. *et al.* (1992) PNAS 89:12048) dans des conditions faiblement stringentes. Un fragment génomique codant le récepteur  $\mu$  contenant les exons  
 30 2 et 3 est obtenu et un fragment Sal I/Spe I de 6,8 kb est excisé et sous-cloné dans pBlueScript (Stratagene). Une cassette Bgl II de 1,6 kb contenant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur PGK (Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell, vol. 66, p. 1105) est insérée dans un site unique BamH I présent dans l'exon 2,  
 35 éliminant ainsi les sites endogènes BamH I et interrompant la séquence codante au niveau de la seconde boucle intracellulaire (acide aminé 193). Le vecteur cible est linéarisé et électroporé dans des cellules (P1)-ES (Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell, vol. 66,

p. 1105). Les clones résistants à la néomycine sont criblés par transfert d'ADN en utilisant une sonde en 5' marquée au  $^{32}\text{P}$  générée par PCR sur les fragments génomiques provenant de la digestion par BamH I. Les mêmes transferts sont ensuite hybridés avec une sonde en 3' générée par PCR, ainsi  
 5 que la sonde Néo constituée par le fragment de 536 pb BamH I-Pvu II de l'ADNc codant pour la néomycine (Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell, vol. 66, p. 1105) pour confirmation de recombinaison homologue.

S'agissant des sondes, elles ont été générées par PCR à partir de l'ADN  
 10 génomique dans la région située entre les sites BamH I et Sal I pour la sonde 5' et proche du site Nco I pour la sonde en 3'. Les oligonucléotides qui ont permis de les obtenir sont les suivants :

sonde 5' : oligo sens: 5'CTGGATAATAATGGAGAAATACAGAC3'

oligo antisens: 5'AGAGGGAGCCTGTAAGCATGAAG3'

15 Taille: 463 pb

sonde 3' : oligo sens: 5'TGTGGCTCCGCAGGTTCTAGCA3'

oligo antisens: 5'TGCACTTGACAACACAGAGTTTA3'

Taille: 1010 pb.

Un clone positif est micro-injecté dans des blastocytes C57BL/6 (Lufkin,  
 20 T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell 66:1105) et donne naissance à des descendants chimériques qui à leur tour sont croisés avec des souris C57BL/6. Des souriceaux de couleur Agouti sont caryotypés par analyse par transfert d'ADN de biopsie de queues et les mâles transmettant la lignée sont utilisés pour fonder une colonie.

25 Résultat : Génération de souris déficientes en MOR.

Le gène du récepteur opioïde  $\mu$  (MOR) est inactivé dans des cellules souche embryonnaire 129/Sv par insertion d'une cassette Néo dans la région codante du gène (figure 1 a). Les événements de ciblage du gène sont identifiés par transfert d'ADN (figure 1 b) et 7 clones parmi 90 résistants à la  
 30 néomycine se sont révélés positifs, représentant une fréquence de ciblage de 1/13ème. L'analyse par transfert d'ADN en utilisant une sonde en 3' générée par PCR et la sonde Néo confirme l'intégration précise d'une copie unique du fragment de gène MOR interrompu (non représenté). Un clone positif ES est utilisé pour établir une souris mutante (figure 1 c). L'analyse par saturation de  
 35 liaison (3H) DAGO ( $[\text{}^3\text{H}]\text{-D-Ala}^2\text{-MePhe}^4\text{Gly-ol}^5$ ) sur des homogénats de cerveaux entiers confirme une réduction de 50% des sites de liaison du récepteur  $\mu$  dans les animaux hétérozygotes et une perte totale de liaison du ligand  $\mu$  dans les mutants homozygotes (figure 2a). Les études

autoradiographiques de liaison (3H) DAGO montrent l'absence de site de liaison du récepteur  $\mu$  dans toutes les coupes de cerveau examinées chez les souris homozygotes et une diminution de moitié chez les souris hétérozygotes. Ces résultats démontrent l'inactivation complète du gène MOR.

5

EXEMPLE 2 :

- **Création d'une lignée de souris mutantes pour laquelle le gène codant pour le récepteur opioïde kappa a été interrompu par recombinaison homologue.**

10 Le gène codant pour le récepteur opioïde kappa de souris a été obtenu, par criblage d'une banque d'ADN génomique de souris SVJ129 (commercialisée par Stratagene, USA) à l'aide d'une sonde de 231 paires de bases (pb) codant pour les acides aminés 6 à 82 du récepteur kappa. Huit clones positifs ont été obtenus et la position du premier exon codant a été  
15 cartographiée en utilisant des techniques standards. Un fragment de restriction BamH I de 6,8 kilopaires de bases (kb, voir figure 10), contenant le premier exon codant, a été sous cloné dans le vecteur pBluescript (Stratagene) dans lequel le site Sma I a été détruit préalablement. Deux sites Sma I ont ensuite été créés par mutagenèse dirigée, l'un sur le site d'initiation de la traduction (CCATGG en CCCGGG), l'autre à l'extrémité 5' de l'exon 1. Ces deux sites  
20 ont ainsi permis de détruire le site d'initiation de la traduction (ATG) et d'éliminer un fragment de 234 pb contenant la majorité de la séquence codante contenue dans l'exon 1 (voir figure 10). Ce fragment a été remplacé par une cassette néo (Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell, vol. 66, p. 1105) contenant le gène de résistance à la  
25 néomycine flanqué d'un promoteur en 5' et d'un signal de polyadénylation en 3' issu du gène PGK (phosphoglycérate kinase). Le vecteur final (voir figure 10) contient 1,3 kb en 5' et 5,2 kb en 3' de séquences du gène kappa. Cette construction a été électroporée dans des cellules embryonnaires souches (ES)  
30 provenant de souris de la lignée SV129. Les cellules ont ensuite été sélectionnées au G418 et les clones résistants ont été sous clonés. L'ADN génomique de ces clones a été isolé et analysé par Southern en utilisant des sondes externes 5' et 3'. Les cellules d'un des clones positifs ont été injectées dans des blastocytes de souris de la lignée C57/BL6 et des souris chimériques  
35 ont été obtenues. Ces chimères, par croisement avec des souris C57/BL6, permettront d'obtenir des souris hétérozygotes puis le croisement de ces souris entre elles permettront d'obtenir les animaux homozygotes.

Détails techniques:

sonde externe 3': correspond à un fragment de restriction BamH I/Sac I d'environ 700 pb situé à 5,2 kb en 3' de l'exon 1 (voir figure 10).

sonde externe 5': correspond à un fragment de restriction Sac I/BamH I d'environ 600 pb situé à 1,3 kb de l'exon 1. Le site BamHI de ce fragment est présent naturellement dans le gène du récepteur kappa (voir figure 10). Le site Sac I correspond à un site de clonage présent dans le phage I Fix II qui a été utilisé pour construire la banque d'ADN génomique de souris.

### EXEMPLE 3 :

**- Création d'une lignée de souris mutantes pour laquelle le gène codant pour le récepteur opioïde delta a été interrompu par recombinaison homologue.**

Une banque génomique de souris (cellules ES SV 129/D3), clonée dans le vecteur EMBL3, a été criblée avec une sonde d'ADNc de souris. Plusieurs clones ont été obtenus. Le clone de phage 17.2, qui a une taille de 14.5 kb et qui contient le premier exon du gène codant pour le récepteur opioïde delta, a été utilisé pour la construction du vecteur pour la recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires de souris. D'abord une carte de restriction a été réalisé autour du premier exon. La construction du vecteur a été fait en quatre étapes: (1) Un fragment EcoR I/Not I de 7.2 kb contenant le premier exon du gène du récepteur opioïde delta a été cloné dans le vecteur pBluescript. (2) Le premier exon a été enlevé en coupant ce plasmide par l'enzyme Sma I. (3) Un fragment de 1.9 kb du vecteur pKJ-1 (Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P. (1991) Cell, 66:1105) contenant le gène de résistance de la Néomycine sous contrôle du promoteur PGK est inséré à cet endroit. (4) Un fragment de 1.3 kb Not I-Sac I du clone de phage 17.2 est ajouté en amont de cette construction. La construction finale est représentée dans la figure 9 et a été vérifié par séquençage.

S'agissant de la sonde 5', elle est représentée par sonde 1 sur la figure 9 et correspond au fragment Sac I-Sac I (représenté par sonde 1 sur la figure 9) indiqué sur la carte de restriction du gène.

S'agissant de la sonde 3', elle est représentée par le fragment obtenu par PCR situé entre les sites EcoR I (voir figure 9, sonde 2). Les oligonucléotides qui ont permis de l'obtenir sont respectivement:

oligonucléotide sens: 5'AGGAAGCCTGGGTCTCCTTC3'

oligonucléotide antisens: 5'GTGCACCATGGGTGTGCAGC3'.

## Tableau 1 :

5      Activité de l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline et basale (FK, 100 mM) dans les homogénats du striatum et cervelet à partir de souris sauvages (+/+) et déficientes homozygotes (-/-) après manque à la morphine induit par la naloxone. Les résultats sont exprimés en pmoles d'AMP cyclique formé/minute/mg de protéine et représente la moyenne  $\pm$  SEM de quatre expériences individuelles en triple. L'étoile indique  $p < 0,05$  comparé au témoin (solution saline).



	$\mu$ + / +		$\mu$ - / -		
	Saline	Morphine	Saline	Morphine	
STRIATUM	Basal	278 $\pm$ 23	401 $\pm$ 22 <sup>*</sup>	304 $\pm$ 16	304 $\pm$ 28
	FK	1130 $\pm$ 71	1473 $\pm$ 43 <sup>*</sup>	1196 $\pm$ 40	1158 $\pm$ 108
CEREBELLUM	Basal	235 $\pm$ 35	209 $\pm$ 30	236 $\pm$ 17	213 $\pm$ 42
	FK	1075 $\pm$ 115	966 $\pm$ 55	1068 $\pm$ 56	979 $\pm$ 73

## METHODES.

Les souris traitées de façon chronique (voir figure 7) soit avec la solution saline soit avec la morphine reçoivent une injection unique de naloxone et sont tuées 1 h après. Les tissus sont homogénéisés dans 10 volumes d'un tampon refroidi à la glace contenant : Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT (dithiothreitol) 0.5 mM, PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) 0.5 mM. Les homogénats (40-100  $\mu$ g de protéine) sont incubés à 37°C pendant 10 minutes dans 60  $\mu$ l d'un milieu test de composition suivante : Tris 50 mM, pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, AMPc 1 mM, ATP 100  $\mu$ M contenant 106 cpm ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-ATP, avec un système de régénération consistant en 5 mM de créatine phosphate et 250 mg/ml de créatine kinase. La quantité de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-AMPc formé est mesurée après séparation d'AMPc à partir d'ATP sur des colonnes d'aluminium comme précédemment décrit (Hanoune, J., Stengel, D., Lacombe, M.L., Feldmann, G. et Coudrier, E. (1977) J. Biol. Chem. 252:2039-2045). La protéine est déterminée en utilisant l'essai Bio-Rad (Bio-Rad, FRG). L'analyse statistique est effectuée en utilisant l'ensemble général linéaire modèle du programme SAS (Cary, N.C. (1989) in SAS Institute Inc.: SAS/STAT User's Guide Version 6 (SAS Institute Corporation), vol. 1).

## RESULTATS.

Le génotype des souris montre que les descendants hétérozygotes suivent la fréquence attendue de Mendel, indiquant l'absence de mortalité *in utero* d'animaux déficients en gène MOR sur les deux allèles. Aucune anomalie morphologique évidente n'a pu être détectée dans les souris mutantes homozygotes et l'anatomie générale de leur cerveau apparaît normale, suggérant l'absence d'implication majeure du gène MOR dans le développement. Les souris déficientes en gène MOR ne diffèrent pas de leurs congénères en santé et en croissance. Les souris homozygotes sont fertiles, sont élevées normalement et aucune incidence de comportement maternel n'a pu être observée.

### 30 Expression des peptides opioïdes endogènes et des sites de liaison du récepteur opioïde :

Pour déterminer si l'absence du récepteur  $\mu$  peut altérer l'expression des récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$ , on a quantifié le nombre de sites de liaison des récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$  sur les homogénats de cerveau entier. L'analyse par le test de Scatchard en utilisant des ligands radiomarqués spécifiques de  $\delta$  (NTI) et  $\kappa$  (CI977) 35 montre des courbes de liaison superposables pour les cerveaux des souris +/+, +/- et -/- (figure 2 a), et des valeurs de Kd et de B max (nombre de sites récepteurs) concordent avec celles rapportées dans la littérature (Boyle

S.J. *et al.* (1990) *Molecular Neuropharmacology* 1:23-29 ; Fang R.J. *et al.* (1994) *Journal of Pharmacol. Exp. Therapeutics* 268:836-846 et Robson L.E. *et al.* (1985) *European Journal of Pharmacol.* 112:65-71). Ces résultats montrent que le nombre total de récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$  n'est pas modifié dans les animaux déficients en récepteur  $\mu$ . Etant donné que la distribution des récepteurs peut néanmoins être modifiée, on a effectué une cartographie par autoradiographie complète à partir du bulbe olfactif dans les régions du cerveau frontales et médianes. Dans les souris de type sauvage, la distribution anatomiques des sites  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  est similaire à celui reporté dans les autres souris (Moskowitz and Goodman, 1985 ; Dupin *et al.*, 1991 ; Sharif and Hughes, 1989) et le rat (Mansour *et al.*, 1987 ; Boyle *et al.*, 1990). La liaison aux récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$  est présente dans toutes les régions dans lesquelles la liaison est détectée dans les souris de type sauvage. Il y a cependant quelques différences quantitatives de région et un nombre plus faible de récepteurs a été détecté par la deltorphine 1 chez la souris  $-/-$ . On n'a pas encore déterminé si cette différence est d'ordre méthodologique ou réelle.

Trois précurseurs des peptides opioïdes ont été décrits dans le système nerveux central, le proencéphaline (PENK), la prodynorphine (PDYN) et la proopiomelanocortine (POMC). La synthèse de POMC est réduite au noyau arqué de l'hypothalamus dans le cerveau, tandis que les transcrits PENK et PDYN ont des distributions qui se recouvrent substantiellement dans les ganglions de base (Kachaturian *et al.* (1993) *Handbook of Exp. Pharmacol.* vol. 104/I, Opioids I. Ed. A. Herz). On a investigué l'effet de l'absence du récepteur  $\mu$  sur l'expression de ces gènes en utilisant l'analyse par hybridation *in situ*. Il n'y a pas de modification dans le réseau d'expression de PENK dans le tubercule olfactif, le cortex piriforme, le noyau accumbens et le striatum parmi les génotypes de souris (figure 3 a). Dans les ganglions de base, l'ARNm de PDYN est trouvé élevé dans accumbens et moins abondant dans caudate-putamen pour les trois cerveaux de souris  $+/+$ ,  $+/-$  et  $-/-$  (figure 3 a). De plus, le radiomarquage des noyaux supraoptique et hypothalamiques paraventriculaires par la sonde PDYN est inchangé (pas représenté), l'expression de POMC est limitée aux neurones arqués dans les trois souches de souris (figure 3 a), avec un nombre similaire et une distribution de cellules contenant le transcript (figure 3 b). Enfin, l'expression de POMC est aussi recherchée dans la glande pituitaire et un fort marquage du lobe intermédiaire est observé avec aucune différence significative dans les animaux déficients en récepteur  $\mu$  (figure 3 b). Par conséquent, les schémas de marquage paraissent non distinguables parmi les génotypes, suggérant que les niveaux de distribution

et d'expression des peptides opioïdes sont inchangés en l'absence de récepteurs  $\mu$ .

POMC et PENK codent pour les  $\beta$ -endorphine et les enképhalines, peptides qui, de préférence, ciblent le récepteur  $\mu$ . L'absence de diminution évidente de ces peptides en l'absence de leur récepteur suggère que l'expression du récepteur n'exerce pas de contrôle négatif sur la synthèse des ligands endogènes.

#### **Comportement spontané :**

L'activité locomotrice spontanée des souris mutantes est évaluée dans les boîtes d'activité locomotrice pendant trois sessions faites à 14 h dans des jours consécutifs. Lorsque les animaux sont exposés aux boîtes pour la première fois, aucune différence significative dans l'activité locomotrice n'est observée entre les souris mutantes et leurs congénères de type sauvage. Cependant, une tendance à l'hypolocomotion est observée dans les deux premières sessions. L'activité locomotrice des souris est ensuite mesurée dans les mêmes boîtes durant le jour (14 h) et la nuit (2 h). A la fois les souris mutantes et les souris de type sauvage montrent une augmentation significative de l'activité locomotrice pendant la nuit, suggérant que le rythme circadien n'est pas modifié dans les souris qui manquent de récepteur  $\mu$ . Pendant les périodes du jour et de la nuit, l'activité des animaux mutants est également plus faible dans cet environnement familier, selon l'observation préliminaire faite pendant les deux premières sessions. Ainsi, l'activité locomotrice des animaux déficients en récepteur  $\mu$  et homozygotes est légèrement décru (22% du degré des souris sauvages).

#### **Réponse au traitement aigu et chronique à la morphine :**

Les réponses pharmacologiques obtenues après une administration aiguë et chronique de morphine sont étudiées chez les souris déficientes en récepteur opioïde  $\mu$ . Dans une première expérience, les effets antinociceptifs induits par une injection aiguë de morphine (2 et 6 mg/kg, sous-cutanée) sont évalués dans l'immersion de la queue (latence de retrait de la queue) et plaque chaude (latence de léchage et de saut). Le seuil nociceptif des souris mutantes et de type sauvage est le même dans les différents paramètres évalués dans les deux tests, suggérant l'absence d'implication du récepteur  $\mu$  dans la perception nociceptive de base. Dans les souris de type sauvage, l'administration de morphine induit des réponses antinociceptives significatives dans le test d'immersion de la queue, et dans le léchage, et dans le saut du test de la plaque chaude. Dans les mutants, aucune réponse antinociceptive n'est induite par la morphine dans aucun de ces seuils nociceptifs (figure 5).

Dans une seconde expérience, les propriétés de renforcement de la morphine sont recherchées dans le même groupe d'animaux en utilisant le paradigme de conditionnement à la plaque (Valverde *et al.* (1996) *Psychopharmacology* 123:119-126). L'administration de morphine induit une préférence de place conditionnée chez les souris de type sauvage, comme le montre une augmentation significative du temps passé dans le compartiment associé à la morphine pendant la phase de test. Ce comportement conditionné n'est pas observé chez les souris mutantes, qui passent le même temps dans le compartiment destiné à la morphine dans les phases de conditionnement (figure 6). La réponse observée dans ce test est probablement due à une perte de propriétés d'auto-récompense de la morphine chez les souris dépourvues de récepteur opioïde  $\mu$ .

Dans une troisième expérience, un degré de dépendance important est induit en donnant des doses augmentées de morphine, et la manifestation de symptômes (somatiques) de manque est évaluée après l'administration de naloxone. Après traitement chronique à la morphine, les souris de type sauvage mais pas les mutantes montrent les signes classiques de rongeurs traités aux opiacés, tels que le réflexe de Straub et l'activité locomotrice augmentée. L'administration de naloxone ne change pas le comportement dans les témoins auxquels on administre une solution saline et induit les différents symptômes comportementaux du manque dans les animaux sauvages traités par la morphine (figure 7). Dans les animaux mutants traités chroniquement à la morphine, l'injection de naloxone n'induit aucune modification comportementale, montrant l'absence de dépendance à la morphine dans les souris déficientes en récepteur opioïde  $\mu$ .

Le traitement aux opiacés chronique augmente la réponse de la voie de transduction du signal d'AMP cyclique spécifiquement dans les zones du cerveau impliquées dans la tolérance aux opiacés et la dépendance (locus coeruleus, amygdales, striatum) (Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K.A., Crain, S.M. and Nestler, E.J. *Brain Res.*, 548:100-110 (1991); Duman, R.S., Tallman, J.F. and Nestler, E.J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246:1033-1039 (1988)), un phénomène que l'on pense être impliqué dans le syndrome du manque (Nestler, E.J., Hope, B.T. and Widnell, K.L. *Neuron*, 11:995-1006 (1993)). Pour fournir une base biochimique pour la dernière observation comportementale, on a quantifié l'activité de l'adénylate cyclase de base et stimulée par la forskoline dans le striatum de souris sauvages et de souris déficientes après manque de morphine induite par la naloxone. L'analyse statistique montre une interaction significative

(corrélation) entre le traitement à la morphine et le génotype +/+ pour à la fois l'activité d'adénylate cyclase de base ( $F(1,12)=7.15$ ,  $p=0.0203$ ) et stimulée par la forskoline ( $F(1,12)=7.36$ ,  $p=0.0189$ ). Ainsi, l'administration de naloxone après traitement chronique à la morphine résulte dans une activité d'adénylate cyclase du striatum augmentée de 30% chez les souris sauvages selon les observations précédentes (Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K.A., Crain, S.M. and Nestler, E.J. Brain Res., 548:100-110 (1991)). Au contraire, l'accroissement de l'activité de cyclase est absente chez les animaux déficients en récepteur  $\mu$ . Comme témoin négatif, on a utilisé l'activité d'adénylate cyclase dans le cerebellum, une région naturellement dépourvue de récepteurs  $\mu$ , et on a trouvé aucun changement significatif entre les différents groupes. Ce résultat suggère que l'absence de récepteur  $\mu$  chez les animaux mutants homozygotes empêche le développement de l'activité de l'adénylate cyclase et supporte l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la voie de l'AMP cyclique est impliquée dans l'abstinence aux opiacés.

#### CONCLUSIONS.

Aucune anomalie morphologique évidente n'est détectée chez ces souris, qui grandissent et se reproduisent normalement et présentent une activité circadienne préservée.

On a étudié les sites de liaison des récepteurs opioïdes ( $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ ) par analyse par saturation et cartographie par autoradiographie sur des sections du cerveau et on a analysé les figures d'expression des gènes des peptides endogènes opioïdes (proenképhaline, prodynorphine et proopiomélanocortine) par hybridation *in situ*. On montre une absence totale de sites de liaison des récepteurs opioïdes  $\mu$  dans les souris  $-/-$ , sans changement marqué dans le nombre de sites  $\delta$  et  $\kappa$  dans ces animaux. On a analysé la distribution de l'expression des peptides opioïdes et observé que l'on ne peut pas faire de distinction entre les souris de type sauvage et mutantes. Ces observations indiquent que des changements compensatoires sont intervenus dans le système opioïde endogène en l'absence du récepteur  $\mu$ .

On dispose par conséquent d'un modèle animal pour étudier l'analgésie induite par les opiacés, l'auto-récompense et la dépendance physique. Des expériences pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* réalisées antérieurement avaient montré que les trois sous-types de récepteurs opioïdes seraient impliqués dans la régulation du stimulus nociceptif. De plus, à la fois les récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  sont impliqués dans les propriétés d'auto-récompense des opiacés et sont des candidats pour participer à l'expression de la dépendance physique aux opiacés. Le but de la présente étude est donc de déterminer la

contribution des récepteurs  $\mu$  en réponse aux opiacés *in vivo* et pour mesurer la réponse comportementale des animaux, nous avons utilisé la morphine comme médicament prototype opiacé.

On a étudié l'analgésie induite par la morphine en utilisant les tests d'immersion de la queue et de la plaque chaude, où la réponse nociceptive implique de façon prédominante des mécanismes respectivement spinaux et supraspinaux. En l'absence de médicament, les seuils de douleurs sont identiques entre les souris  $+/+$  et  $-/-$ , suggérant que le récepteur opioïde  $\mu$  n'est pas impliqué dans le maintien d'une perception normale de la douleur ou que son rôle physiologique peut être compensé par d'autres mécanismes différents du système opioïde endogène. La morphine induit une analgésie dépendant de la dose dans les animaux de type sauvage, mais, la morphine est complètement sans effet chez les souris déficientes en récepteur  $\mu$ . L'absence de réponse à la morphine dans le test de l'immersion de la queue est particulièrement intéressante et conduit à reconsidérer le rôle des autres récepteurs opioïdes dans l'analgésie spinale.

Les propriétés d'auto-récompense de la morphine dans le paradigme de la préférence de place sont également étudiées. Le phénotype des souris mutantes est clair: aucune préférence de place conditionnée n'est observée chez les souris mutantes, tandis que la morphine induit des effets ré-enforceants marqués chez les souris de type sauvage.

Une forte dépendance physique est également induite par l'injection de doses croissantes de morphine (jusqu'à 100 mg/kg) et le syndrome manque induit en injectant l'antagoniste naloxone opioïde non spécifique. Dans les souris de type sauvage, la naloxone provoque les signes somatiques classiques de manque, de même que la perte de poids et l'hypothermie. Au contraire, les souris homozygotes déficientes en récepteur  $\mu$  ne présentent aucun des signes comportemental ou végétatif d'abstinence observés chez les animaux de type sauvage. Afin de donner un support biochimique à ce dernier résultat, on a mesuré l'activité de l'adénylate cyclase dans le striatum des souris abstinentes. On a trouvé une augmentation de 30% de l'activité de l'adénylate cyclase de base et de celle induite par la forskoline chez les souris de type sauvage en manque de morphine, ainsi que précédemment décrit dans la littérature. Au contraire, aucune modification des niveaux de formation d'AMP cyclique n'est observée dans les souris mutantes.

Cet ensemble de résultats est d'un intérêt primordial pour la compréhension de l'action biologique des médicaments opiacés. Par la présente invention, on rapporte l'identification de la cible moléculaire de la morphine.

On démontre également que l'activité du gène MOR est absolument essentielle pour l'analgésie induite par la morphine, les effets d'auto-récompense et de dépendance physique. De plus, on montre également par la présente invention que les récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$  n'interviennent pas dans les actions biologiques de la morphine - même partiellement - en l'absence du récepteur  $\mu$ , bien que ces récepteurs soient exprimés et se lient aux ligands opioïdes chez les souris mutantes. Par conséquent, le produit du gène du récepteur opioïde  $\mu$  n'est pas seulement la cible préférée de la morphine, comme décrit, mais également un composant nécessaire à l'action des opiacés. La présente approche génétique montre pour la première fois le rôle indispensable du récepteur opioïde  $\mu$  dans de multiples actions des opiacés.



## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un animal mammifère transgénique non humain dont l'expression du gène codant pour un récepteur aux opiacés est modifiée, notamment dans les tissus nerveux par rapport à une expression normale, notamment dans les tissus nerveux, pour la détermination d'un médicament actif sur les pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés, notamment les douleurs sévères aiguës ou chroniques, la toxicomanie, ou la prévention ou le traitement des rejets de greffe.

2. Utilisation selon la revendication 1, d'un animal mammifère transgénique non humain qui n'exprime plus l'un au moins des récepteurs suivants : le récepteur aux opiacés de type mu, le récepteur aux opiacés de type kappa et le récepteur aux opiacés de type delta.

3. Animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 2 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

- soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase-1 (PGK-1), l'expression du gène de type mu étant supprimée.

4. Animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type delta, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 1 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

- soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase -1 (PGK-1), l'expression du gène de type delta étant supprimée.

5 5. Animal mammifère transgénique non humain ou cellules de mammifères contenant le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel un fragment du gène du récepteur contenant un exon, notamment l'exon 1 est

- soit remplacé par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié,

10 - soit interrompu par l'insertion entre deux nucléotides contigus par tout ou partie d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment le gène de résistance à la néomycine (neo) sous le contrôle du promoteur phosphoglycérate kinase -1 (PGK-1), l'expression du gène kappa étant supprimée.

15 6. Cellules cultivées à partir des animaux mammifères transgéniques non humains selon l'une des revendications 3 à 5.

20 7. Mammifère transgénique non humain obtenu par introduction dans un blastocyte de cellules souches embryonnaires (cellules ES) comportant dans leur génome l'une des constructions selon l'une des revendications 3 à 5, obtenu par recombinaison homologue, sélection d'animaux chimères mâles selon un critère correspondant à la lignée ES, croisement des animaux sélectionnés avec des souris, notamment des souris C57BL/6, pour obtenir des animaux hétérozygotes par rapport à l'une des constructions selon l'une des revendications 3 à 5 et éventuellement croisement de deux hétérozygotes pour  
25 obtenir un animal homozygote par rapport à l'une des constructions selon l'une des revendications 3 à 5.

30 8. Procédé d'obtention d'un modèle transgénique pour l'étude des pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés de type mu, ou les récepteurs aux opiacés de type delta ou les récepteurs aux opiacés de type kappa, et de leur traitement, comprenant

35 - le remplacement du gène endogène du récepteur aux opiacés de type  $\mu$ , ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type delta ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans des cellules notamment embryonnaires souches de souris (ES), par une construction comprenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

- 5 \* l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou
- \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou
- 10 \* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,
- et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion
- 15 de la cassette PGK-neo,
- ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,
- 20 ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo,
- et
- 25 - l'introduction des susdites cellules dans des embryons, notamment des blastocytes de mammifères non humains,
- la sélection d'animaux chimères mâles selon un critère correspondant à la lignée ES,
- le croisement des animaux sélectionnés avec des souris, notamment des
- 30 souris C57BL/6, pour obtenir des animaux hétérozygotes par rapport à l'une des constructions selon l'une des revendications 3 à 5 et
- éventuellement le croisement de deux hétérozygotes pour obtenir un animal homozygote par rapport à l'une des constructions selon l'une des revendications 3 à 5.

35

9. Procédé de criblage de médicaments actifs sur des pathologies impliquant les récepteurs aux opiacés, notamment les pathologies suivantes :

douleurs sévères aiguës ou chroniques, toxicomanie, prévention ou traitement de rejet de greffes, comprenant :

- l'administration à un mammifère non humain transgénique ou à des cellules de mammifères non humains transgéniques contenant à la place du gène endogène du récepteur aux opiacés de type mu, ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type delta, ou du gène endogène du récepteur aux opiacés de type kappa, une construction contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

\* l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

\* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

\* un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,

et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion de la cassette neo,

ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,

ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo ;

- la détermination des seuils nociceptifs par le test de l'immersion de la queue et de la plaque chaude après injection des drogues à tester,

- et la détermination de la réponse aux drogues à tester pour les animaux dans lesquels on a produit une douleur chronique induite par l'injection de produits irritants carrhagénane et adjuvant de Freund et produisant des

monoarthrites ou polyarthrites, ou le test de section du nerf sciatique, ou le test de ligature du nerf sciatique dans le cas de douleurs neuropathiques,

- ou la détermination des propriétés psychotropes des drogues à tester par les tests de préférence de place ou d'auto-administration ou la détermination du niveau de dépendance physique par l'induction d'une dépendance sévère et la provocation d'un sevrage dans le cas de la toxicomanie,

- ou la détermination de la réaction mixte lymphocytaire et de la durée de vie des souffrances dans le cas de la prévention ou du traitement du rejet de greffes.

10. Construction transgénique contenant le gène du récepteur aux opiacés de type mu, ou le gène du récepteur aux opiacés de type delta ou le gène du récepteur aux opiacés de type kappa, dans lequel respectivement

- l'exon 2 du gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu entre deux nucléotides contigus par une portion d'un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

- un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI, ou

- un fragment contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa est remplacé par un gène marqueur sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment une cassette contenant le gène neo sous le contrôle du promoteur PGKI,

et en particulier dans lequel le gène du récepteur aux opiacés de type mu est interrompu au site BamHI de l'exon 2 par l'insertion de la cassette neo,

ou le fragment génomique Sma I-Sma I de 600 pb, contenant l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type delta est remplacé par la cassette PGK-neo,

ou le fragment génomique de 235 pb de l'exon 1 du gène du récepteur aux opiacés de type kappa contenant l'ATG initiateur de l'exon 1 et 232 paires de bases en aval du susdit ATG est remplacé par la cassette PGK-neo.



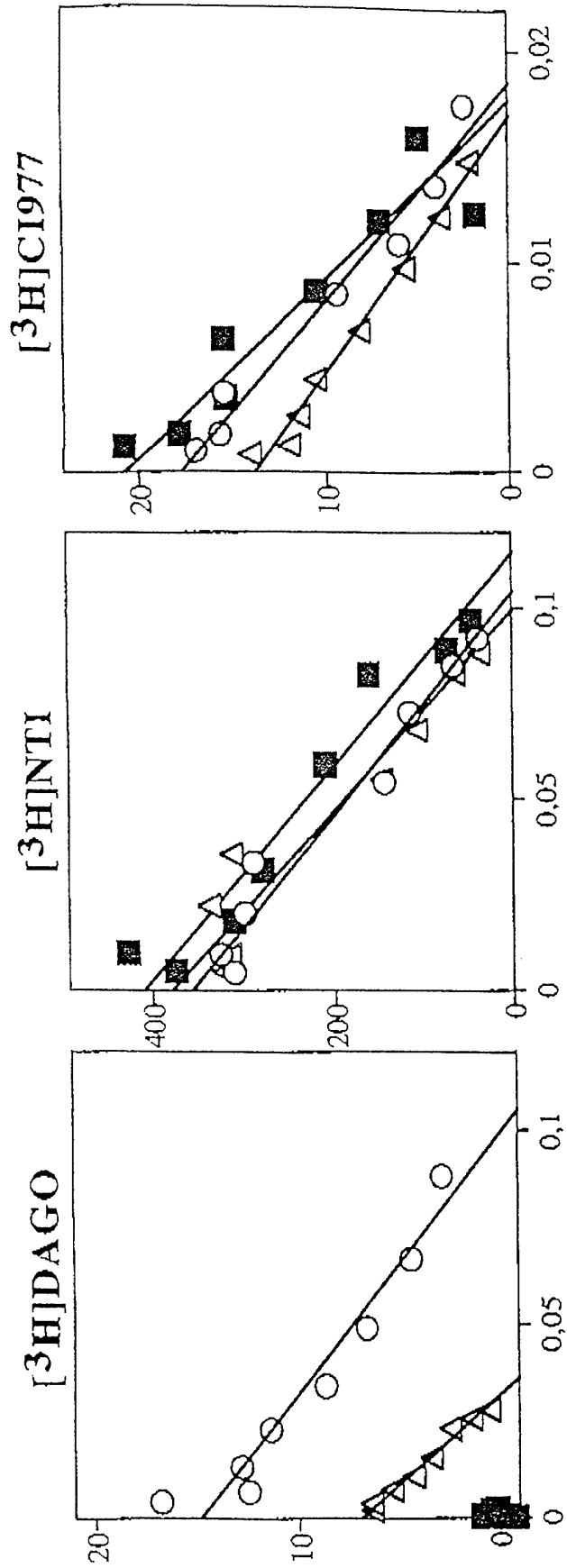


Figure 2A

3/20

+/-

2750825

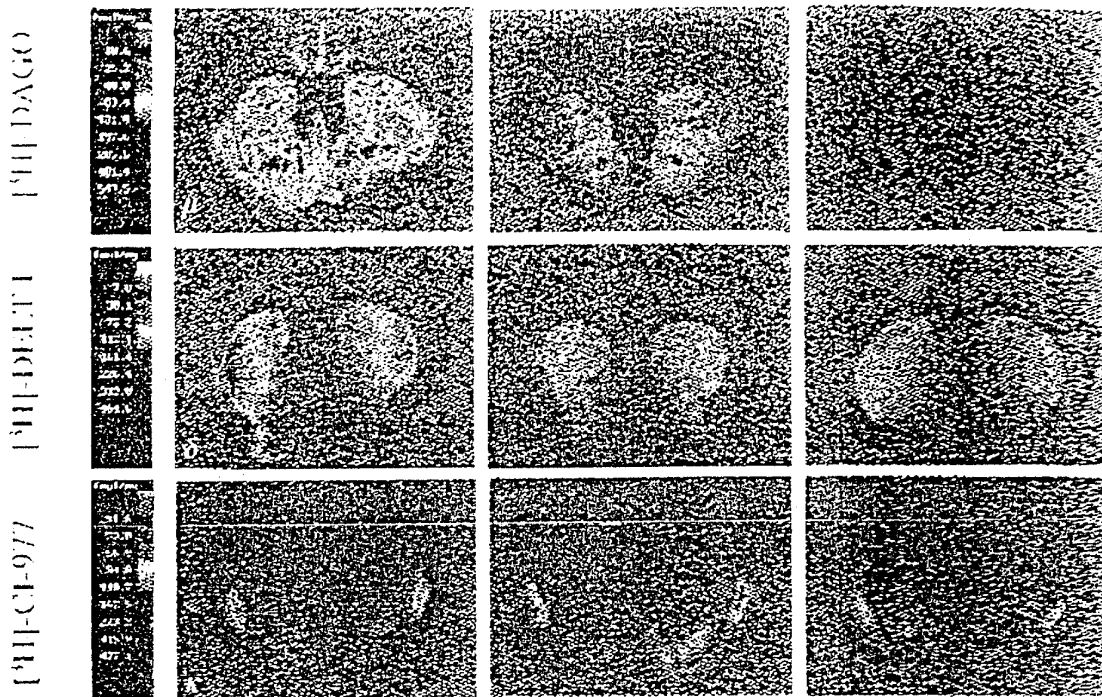
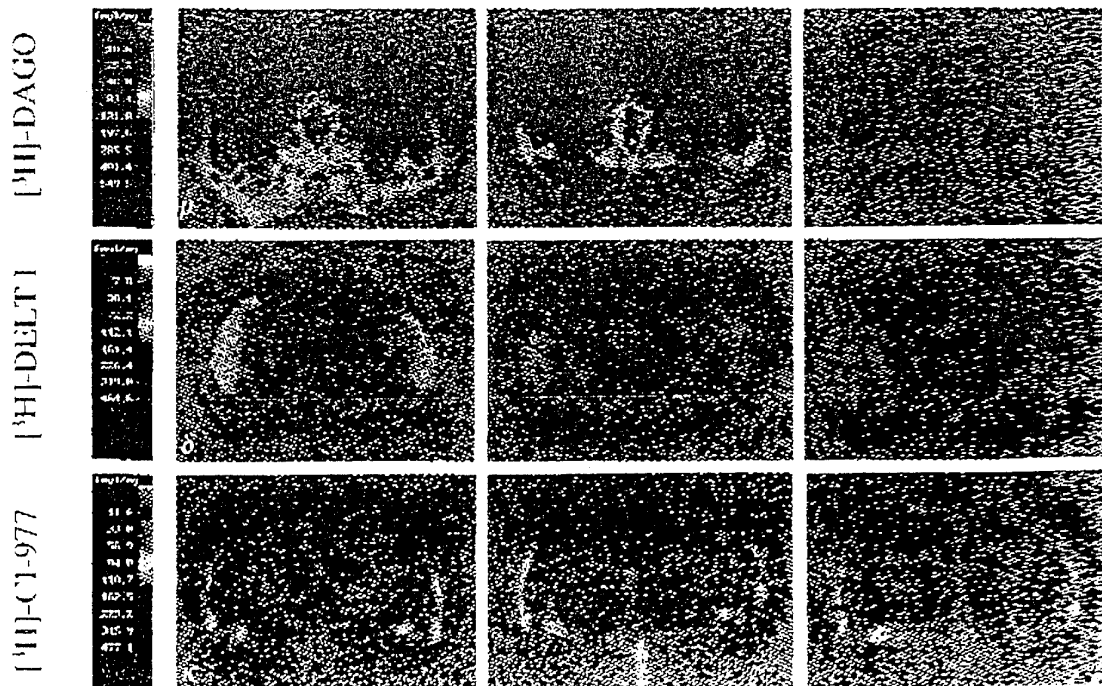


Figure 2B

Figure 2C





4/20

Figure 3A

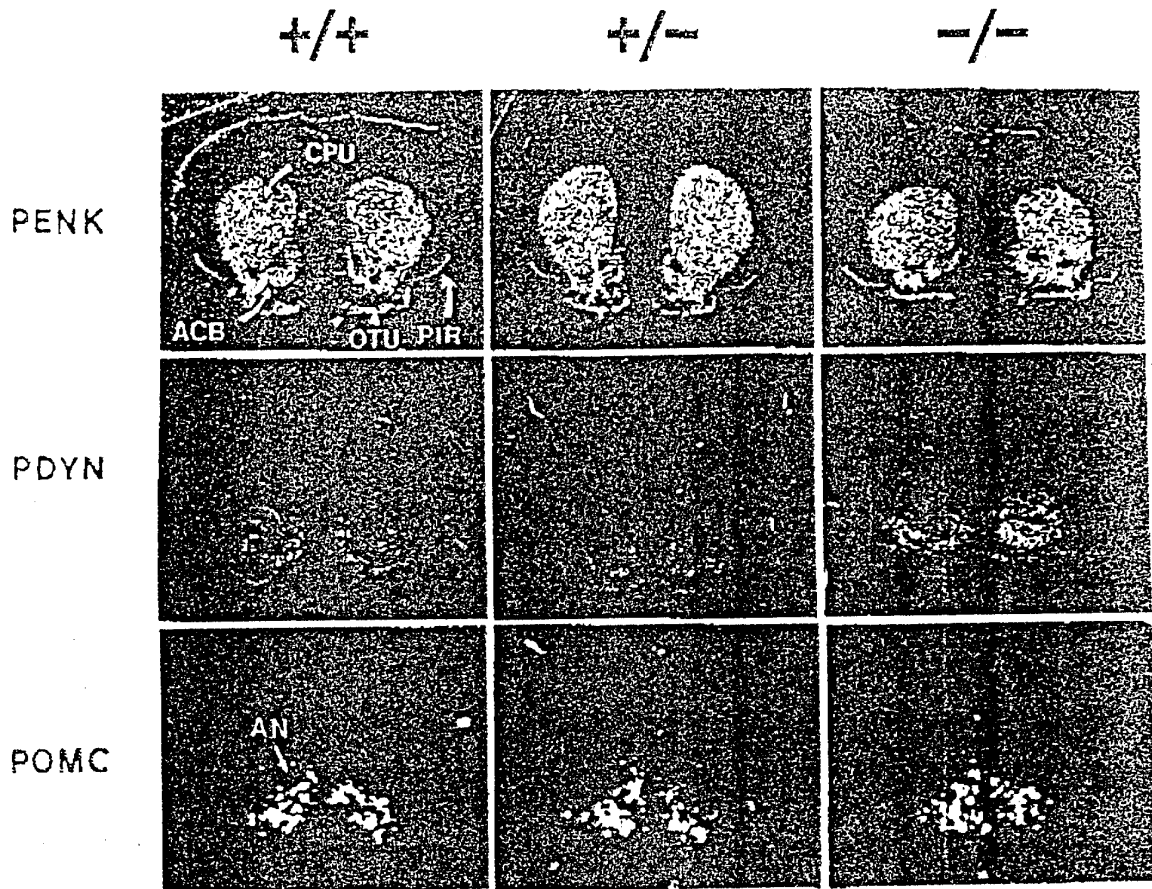
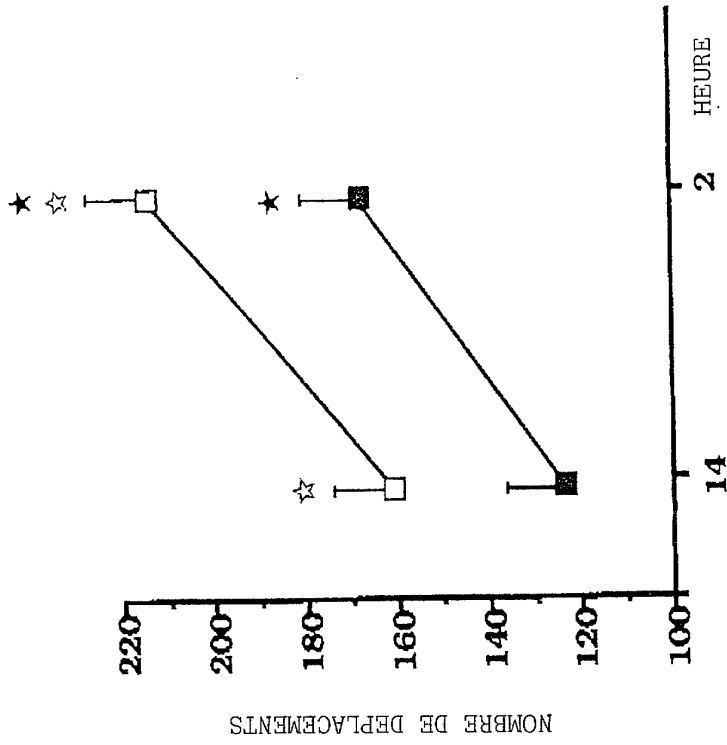


Figure 3B

**b**



**a**

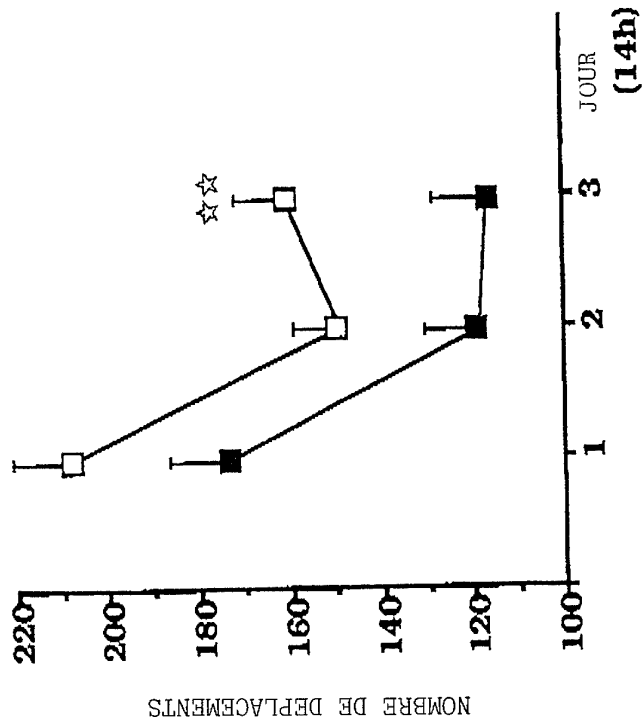
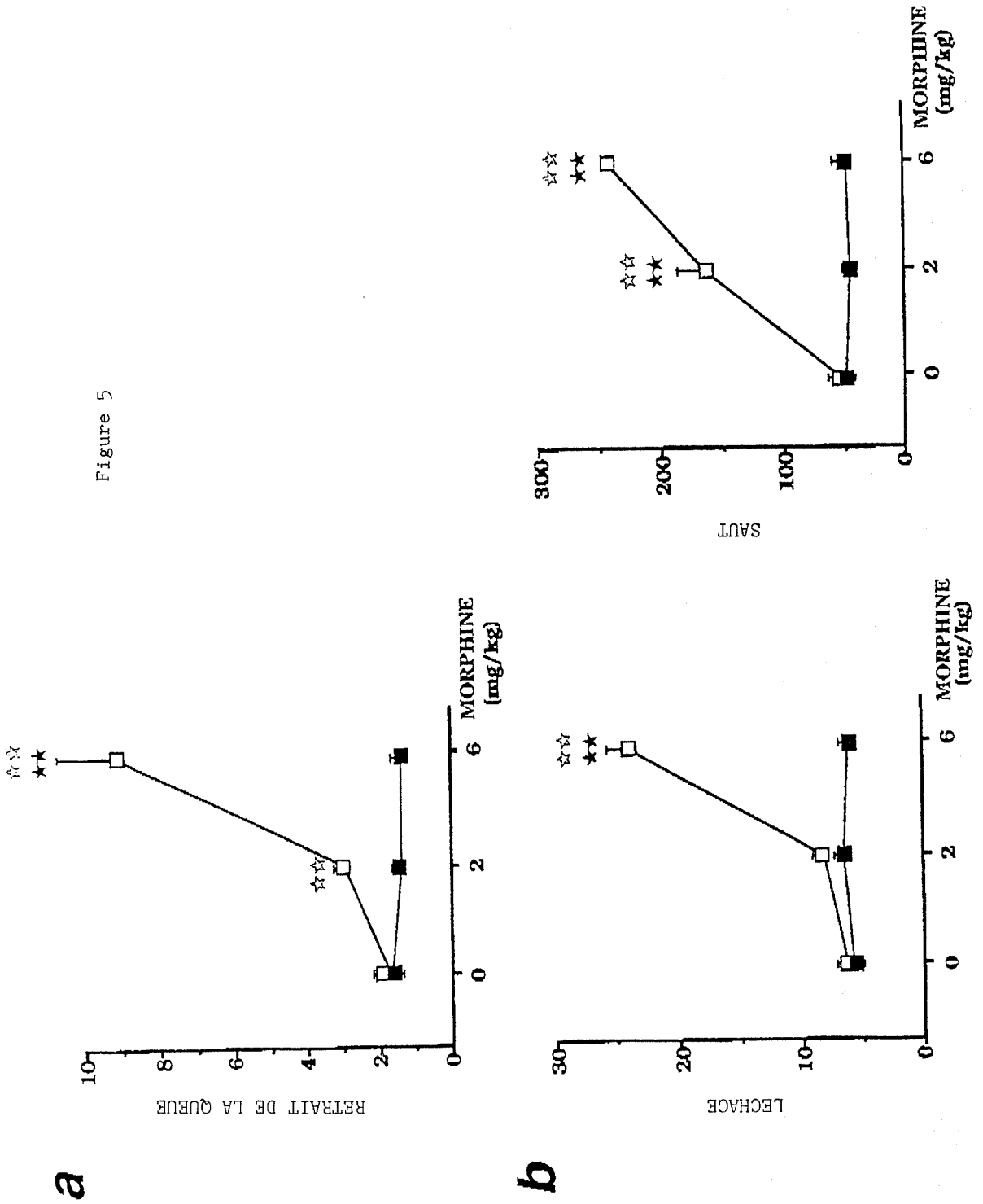


Figure 4

Figure 5



7/20

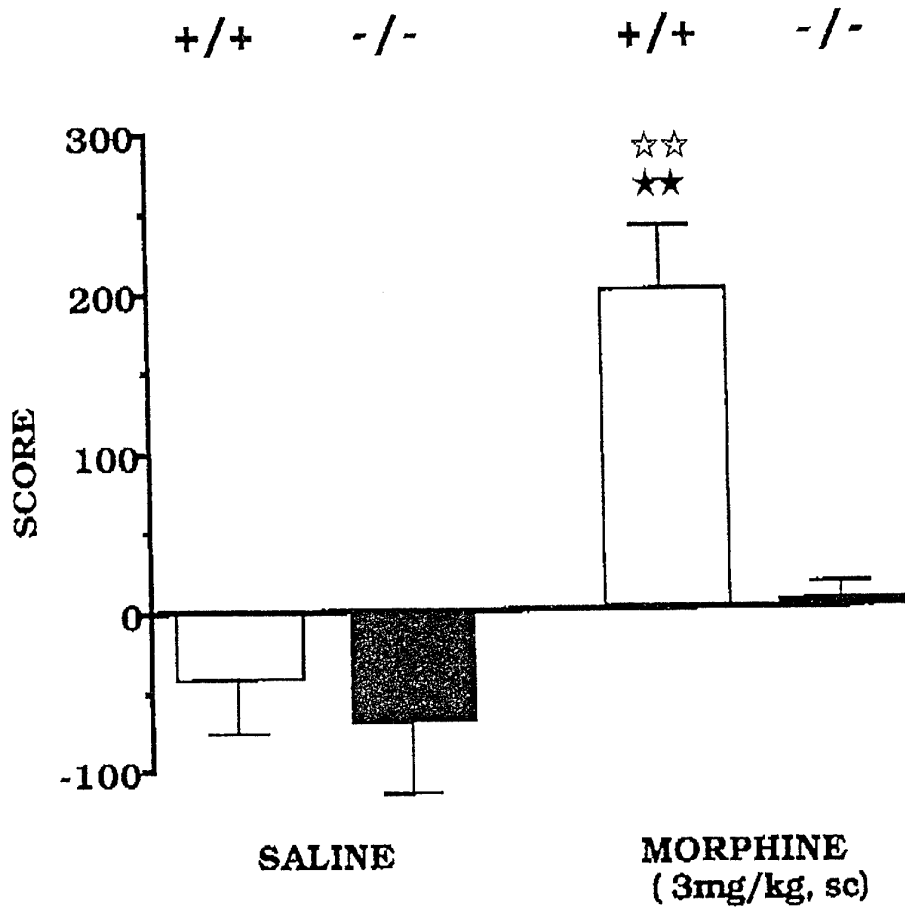


Figure 6

Figure 7A

**a**

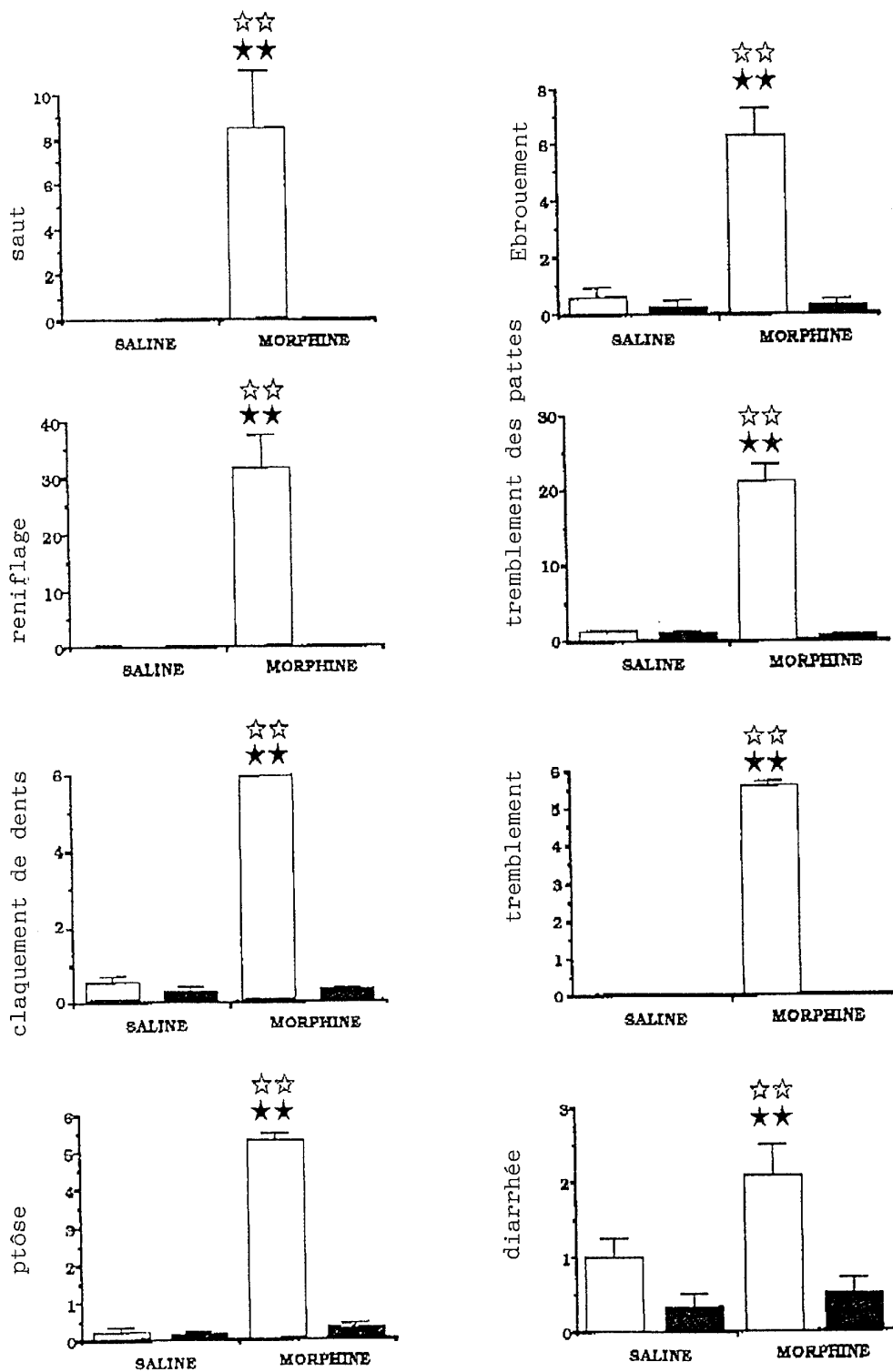
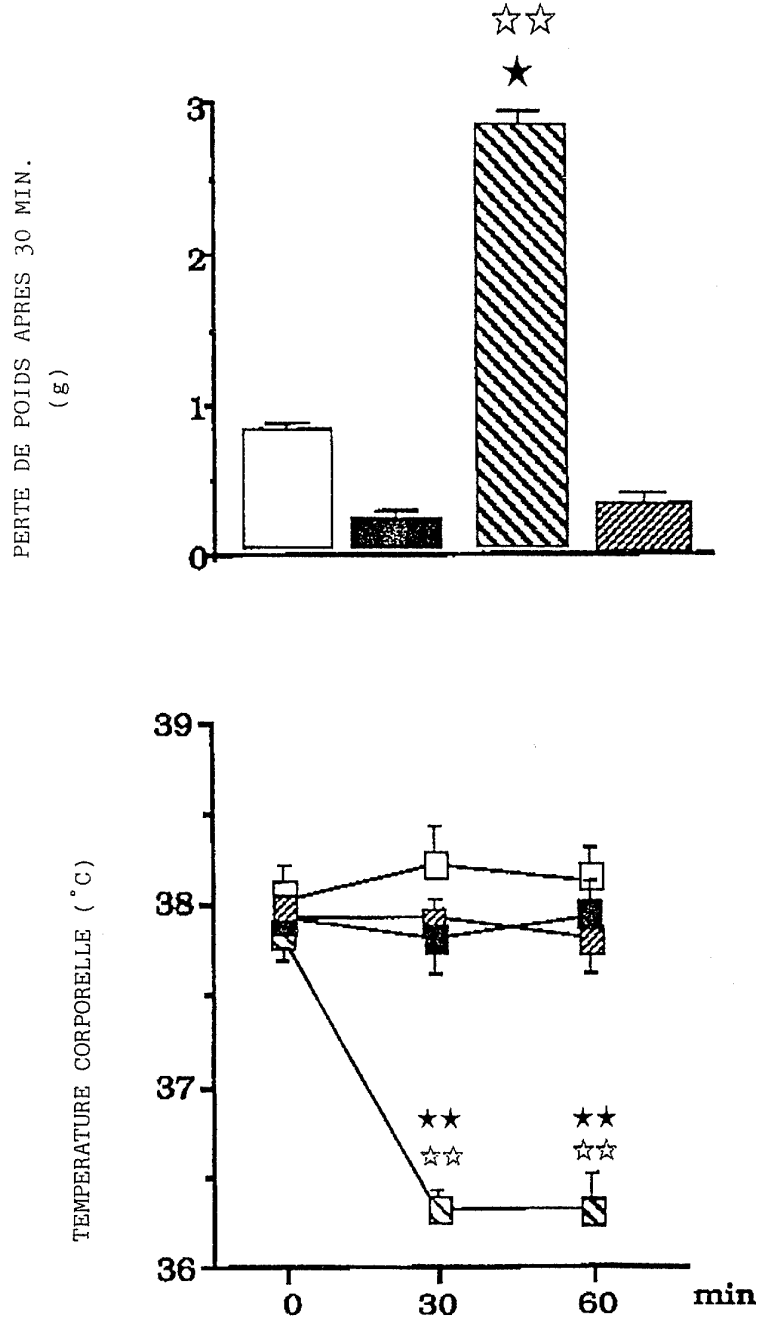


Figure 7B

**b**



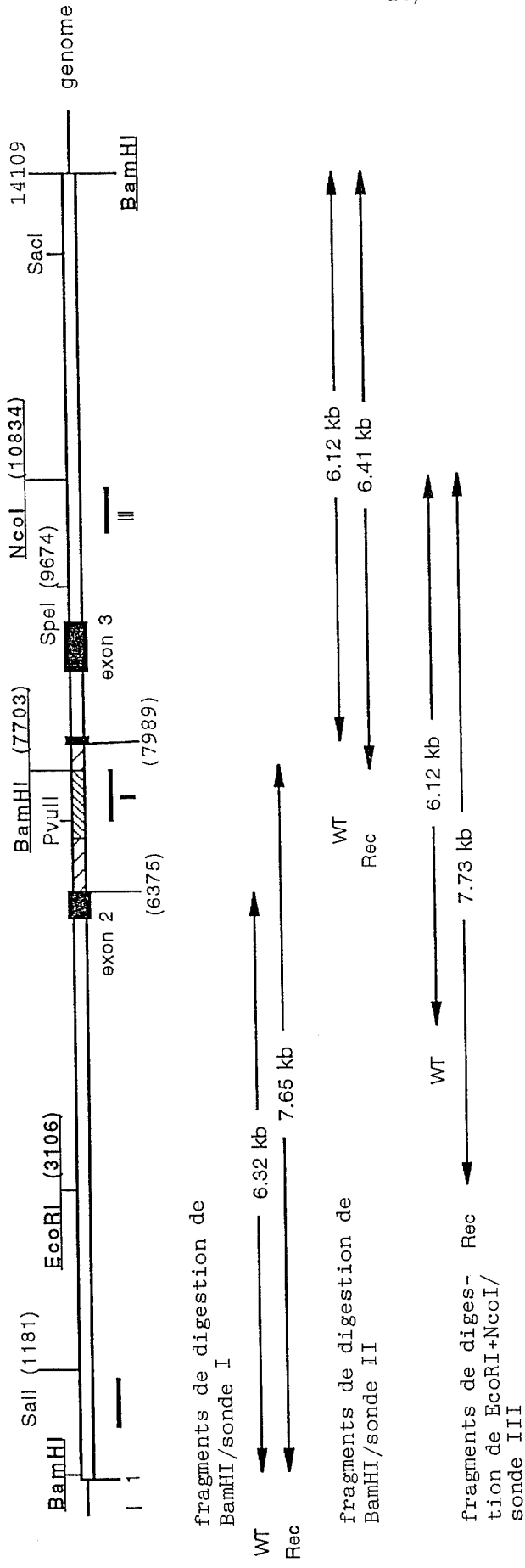


Figure 8

Figure 9

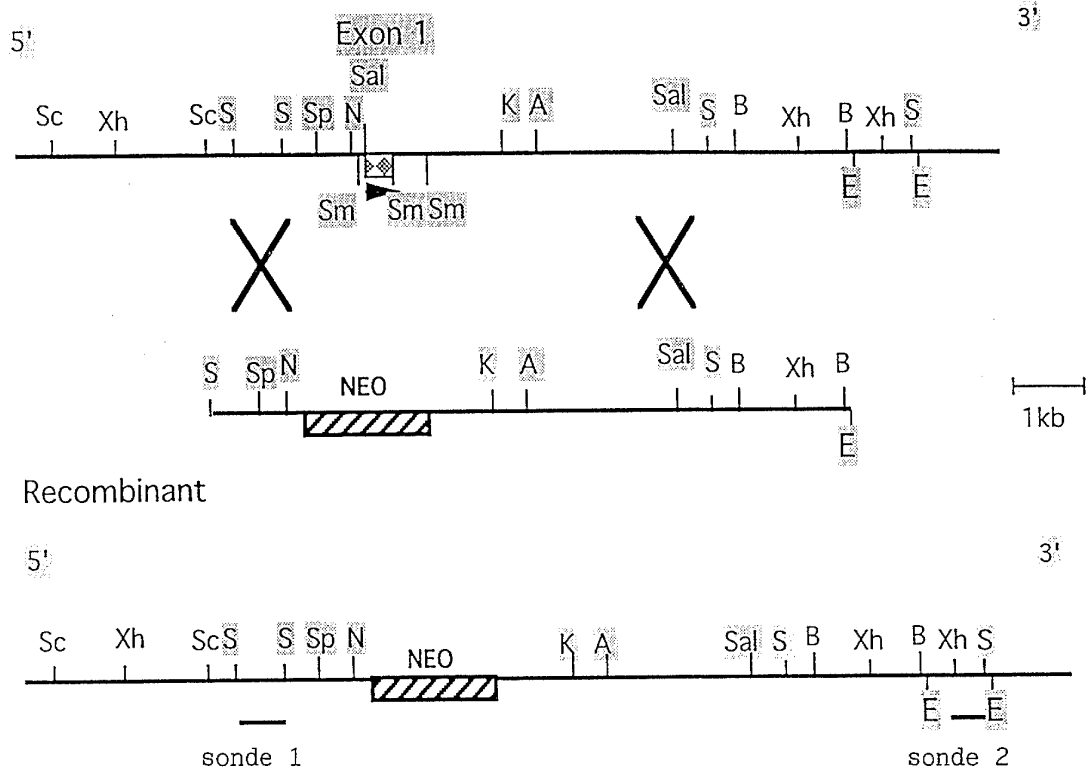
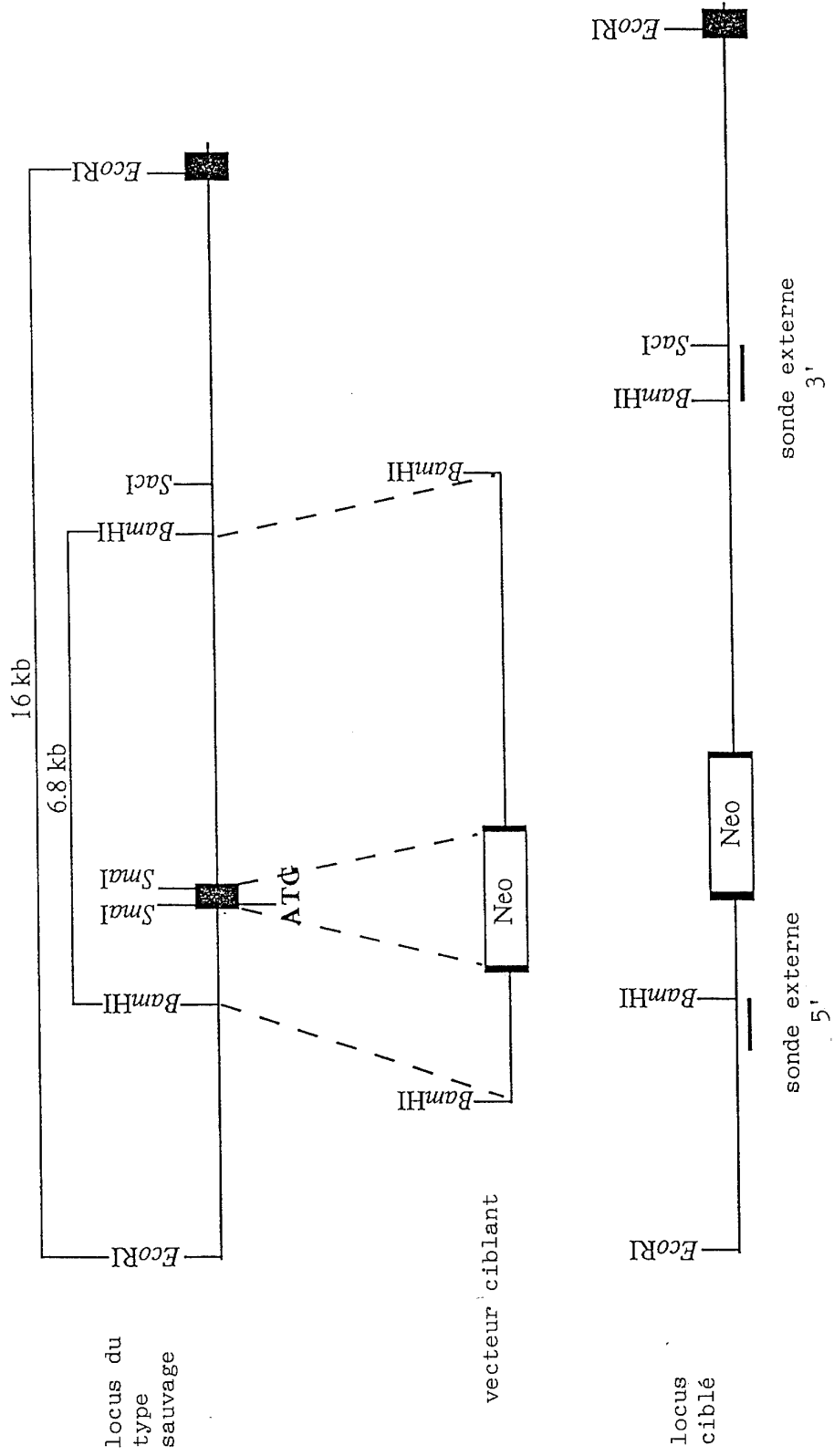




Figure 10



## mMOR

1/1 31/11  
 CGG ATC CTT AGC ATC CCC AAA GCG CCT CCG TGT ACT TCT AAG GTG GGA GGG GGA TAC AAG  
 61/21 91/31  
 CAG AGG AGA ATA TCG GAC GCT CAG ACG TTC CAT TCT GCC TGC CGC TCT TCT CTG GTT CCA  
 121/41 151/51  
 CTA GGG CTT GTC CTT GTA AGA AAC TGA CGG AGC CTA GGG CAG CTG TGA GAG GAA GAG GCT  
 181/61 211/71  
 GGG GCG CCT GGA ACC CGA ACA CTC TTG AGT GCT CTC AGT TAC AGC CTA CCG AGT CCG CAG  
 241/81 271/91  
 CAA GCA TTC AGA ACC ATG GAC AGC AGC GCC GGC CCA GGG AAC ATC AGC GAC TGC TCT GAC  
 met asp ser ser ala gly pro gly asn ile ser asp cys ser asp  
 301/101 331/111  
 CCC TTA GCT CCT GCA AGT TGG TCC CCA GCA CCT GGC TCC TGG CTC AAC TTG TCC CAC GTT  
 pro leu ala pro ala ser trp ser pro ala pro gly ser trp leu asn leu ser his val  
 361/121 391/131  
 GAT GGC AAC CAG TCC GAC CCA TGC GGT CCT AAC CGC ACG GGG CTT GGC GGG AGC CAC AGC  
 asp gly asn gln ser asp pro cys gly pro asn arg thr gly leu gly gly ser his ser  
 421/141 451/151  
 CTG TGC CCT CAG ACC GGC AGC CCT TCC ATG GTC ACA GCC ATC ACC ATC ATG GCC CTC TAT  
 leu cys pro gln thr gly ser pro ser met val thr ala ile thr ile met ala leu tyr  
 481/161 511/171  
 TCT ATC GTG TGT GTA GTG GGC CTC TTT GGA AAC TTC CTG GTC ATG TAT GTG ATT GTA AGA  
 ser ile val cys val val gly leu phe gly asn phe leu val met tyr val ile val arg  
 541/181 571/191  
 TAT ACC AAA ATG AAG ACT GCC ACC AAC ATC TAC ATT TTC AAC CTT GCT CTG GCA GAT GCC  
 tyr thr lys met lys thr ala thr asn ile tyr ile phe asn leu ala leu ala asp ala  
 601/201 631/211  
 TTA GCC ACT AGC ACG CTG CCC TTT CAG AGT GTT AAC TAC CTG ATG GGA ACG TGG CCC TTT  
 leu ala thr ser thr leu pro phe gln ser val asn tyr leu met gly thr trp pro phe  
 661/221 691/231  
 GGA AAC ATC CTC TGC AAG ATC GTG ATC TCA ATA GAC TAC TAC AAC ATG TTC ACC AGT ATC  
 gly asn ile leu cys lys ile val ile ser ile asp tyr tyr asn met phe thr ser ile  
 721/241 751/251  
 TTC ACC CTC TGC ACC ATG AGT GTA GAC CGC TAC ATT GCC GTC TGC CAC CCG GTC AAG GCC  
 phe thr leu cys thr met ser val asp arg tyr ile ala val cys his pro val lys ala  
 781/261 811/271  
 CTG GAT TTC CGT ACC CCC CGA AAT GCC AAA ATT GTC AAT GTC TGC AAC TGG ATC CTC TCT  
 leu asp phe arg thr pro arg asn ala lys ile val asn val cys asn trp ile leu ser  
 841/281 871/291  
 TCT GCC ATT GGT CTG CCC GTA ATG TTC ATG GCA ACC ACA AAA TAC AGG CAG GGG TCC ATA  
 ser ala ile gly leu pro val met phe met ala thr thr lys tyr arg gln gly ser ile  
 901/301 931/311  
 GAT TGC ACC CTC ACT TTC TCT CAT CCC ACA TGG TAC TGG GAG AAC CTG CTC AAA ATC TGT  
 asp cys thr leu thr phe ser his pro thr trp tyr trp glu asn leu leu lys ile cys

Figure 11

961/321  
 GTC TTC ATC TTC GCC TTC ATC ATG CCG GTC CTC ATC ATC ACT GTG TGT TAT GGA CTG ATG  
 val phe ile phe ala phe ile met pro val leu ile ile thr val cys tyr gly leu met  
 1021/341  
 ATC TTA CGA CTC AAG AGT GTC CGC ATG CTG TCG GGC TCC AAA GAA AAG GAC AGG AAC CTG  
 ile leu arg leu lys ser val arg met leu ser gly ser lys glu lys asp arg asn leu  
 1081/361  
 CGC AGG ATC ACC CGG ATG GTG CTG GTG GTC GTG GCT GTA TTT ATT GTC TGC TGG ACC CCC  
 arg arg ile thr arg met val leu val val val ala val phe ile val cys trp thr pro  
 1141/381  
 ATC CAC ATC TAT GTC ATC ATC AAA GCA CTG ATC ACG ATT CCA GAA ACC ACT TTC CAG ACT  
 ile his ile tyr val ile ile lys ala leu ile thr ile pro glu thr thr phe gln thr  
 1201/401  
 GTT TCC TGG CAC TTC TGC ATT GCC TTG GGT TAC ACA AAC AGC TGC CTG AAC CCA GTT CTT  
 val ser trp his phe cys ile ala leu gly tyr thr asn ser cys leu asn pro val leu  
 1261/421  
 TAT GCG TTC CTG GAT GAA AAC TTC AAA CGA TGT TTT AGA GAG TTC TGC ATC CCA ACT TCC  
 tyr ala phe leu asp glu asn phe lys arg cys phe arg glu phe cys ile pro thr ser  
 1321/441  
 TCC ACA ATC GAA CAG CAA AAC TCT GCT CGA ATC CGT CAA AAC ACT AGG GAA CAC CCC TCC  
 ser thr ile glu gln gln asn ser ala arg ile arg gln asn thr arg glu his pro ser  
 1381/461  
 ACG GCT AAT ACA GTG GAT CGA ACT AAC CAC CAG CTA GAA AAT CTG GAA GCA GAA ACT GCT  
 thr ala asn thr val asp arg thr asn his gln leu glu asn leu glu ala glu thr ala  
 1441/481  
 CCA TTG CCC TAA CTG GGT CCC ACG CCA TCC AGA CCC TCG CTA AAC TTA GAG GCT GCC ATC  
 pro leu pro  
 1501/501  
 TAC TTG GAA TCA GGT TGC TGT CAG GGT TTG TGG GAG GCT CTG GTT TCC TGG AAA AGC ATC  
 1561/521  
 TGA TCC TGC ATC ATT CAA AGT CAT TCC TCT CTG GCT ATT CAC GCT ACA CGT CAG AGA CAC  
 1621/541  
 TCA GAC TGT GTC AAG CAC TCA GAA GGA AGA GAC TGC AGG CCA CTA CTG AAT CCA GCT CAT  
 1681/561  
 GTA CAG AAA CAT CCA ATG GAC CAC AAT ACT CTG TGG TAT GTG ATT TGT GAT CAA CAT AGA  
 1741/581  
 AGG TGA CCC TTC CCT ATG TGG AAT TTT TAA TTT CAA GGA AAT ACT TAT GAT CTC ATC AAG  
 1801/601  
 GGA AAA ATA GAT GTC ACT TGT TAA ATT CAC TGT AGT GAT GCA TAA AGG AAA AGC TAC CTC  
 1861/621  
 TGA CCT CTA GCC CAG TCA CCC TCT ATG GAA AGT TCC ATA GGG AAT ATG TGA GGG AAA ATG  
 1921/641  
 TTG CTT CCA AAT TAA ATT TTC ACC TTT ATG TTA TAG TCT AGT TAA GAC ATC AGG GGC ATC  
 1981/661  
 TCT GTT TCT TGG TTT TGT ATT GTT TGA AAG AAG ACA TCT TCC TCC CTA GCT GCG TGT TGA  
 2041/681  
 AAA TGA AAG GGA TTT AAA ACA CAG TGT CAA CTG CAG AAT AGT TGA TTC TCG CAC TGA AGG

Figure 11 (suite 1)

2101/701	2131/711
GGG GGG GCT AAT CTT CCC AAT TCT TTC CAT GTC CTC CAA GTG TTC ACA AGG TCA AAC TCA	
2161/721	2191/731
GAG TCA CCC AGT AAG CTC ATC ATG CCA CCA TTC TGA GCA AAA TCC TTG GAT TCC TGC TCA	
2221/741	
GAA TGG TGG	

Figure 11 (suite 2)

## mDOR

1/1 31/11  
 TCT AAA GGC TGG GTC CCT GCG CCC AGG GCG CAC GGT GGA GAC GGA CAC GGC GGC GCC ATG  
 met

61/21 91/31  
 GAG CTG GTG CCC TCT GCC CGT GCG GAG CTG CAG TCC TCG CCC CTC GTC AAC CTC TCG GAC  
 glu leu val pro ser ala arg ala glu leu gln ser ser pro leu val asn leu ser asp

121/41 151/51  
 GCC TTT CCC AGC GCC TTC CCC AGC GCG GGC GCC AAT GCG TCG GGG TCG CCG GGA GCC CGT  
 ala phe pro ser ala phe pro ser ala gly ala asn ala ser gly ser pro gly ala arg

181/61 211/71  
 AGT GCC TCG TCC CTC GCC CTA GCC ATC GCC ATC ACC GCG CTC TAC TCG GCT GTG TGC GCA  
 ser ala ser ser leu ala leu ala ile ala ile thr ala leu tyr ser ala val cys ala

241/81 271/91  
 GTG GGG CTT CTG GGC AAC GTG CTC GTC ATG TTT GGC ATC GTC CGG TAC ACC AAA TTG AAG  
 val gly leu leu gly asn val leu val met phe gly ile val arg tyr thr lys leu lys

301/101 331/111  
 ACC GCC ACC AAC ATC TAC ATC TTC AAT CTG GCT TTG GCT GAT GCG CTG GCC ACC AGC ACG  
 thr ala thr asn ile tyr ile phe asn leu ala leu ala asp ala leu ala thr ser thr

361/121 391/131  
 CTG CCC TTC CAG AGC GCC AAG TAC TTG ATG GAA ACG TGG CCG TTT GGC GAG CTG CTG TGC  
 leu pro phe gln ser ala lys tyr leu met glu thr trp pro phe gly glu leu leu cys

421/141 451/151  
 AAG GCT GTG CTC TCC ATT GAC TAC TAC AAC ATG TTC ACT AGC ATC TTC ACC CTC ACC ATG  
 lys ala val leu ser ile asp tyr tyr asn met phe thr ser ile phe thr leu thr met

481/161 511/171  
 ATG AGC GTG GAC CGC TAC ATT GCT GTC TGC CAT CCT GTC AAA GCC CTG GAC TTC CGG ACA  
 met ser val asp arg tyr ile ala val cys his pro val lys ala leu asp phe arg thr

541/181 571/191  
 CCA GCC AAG GCC AAG CTG ATC AAT ATA TGC ATC TGG GTC TTG GCT TCA GGT GTC GGG GTC  
 pro ala lys ala lys leu ile asn ile cys ile trp val leu ala ser gly val gly val

601/201 631/211  
 CCC ATC ATG GTC ATG GCA GTG ACC CAA CCC CGG GAT GGT GCA GTG GTA TGC ATG CTC CAG  
 pro ile met val met ala val thr gln pro arg asp gly ala val val cys met leu gln

661/221 691/231  
 TTC CCC AGT CCC AGC TGG TAC TGG GAC ACT GTG ACC AAG ATC TGC GTG TTC CTC TTT GCC  
 phe pro ser pro ser trp tyr trp asp thr val thr lys ile cys val phe leu phe ala

721/241 751/251  
 TTC GTG GTG CCG ATC CTC ATC ATC ACG GTG TGC TAT GGC CTC ATG CTA CTG CGC CTG CGC  
 phe val val pro ile leu ile ile thr val cys tyr gly leu met leu leu arg leu arg

Figure 12

781/261 811/271  
 AGC GTG CGT CTG CTG TCC GGT TCC AAG GAG AAG GAC CGC AGC CTG CGG CGC ATC ACG CGC  
 ser val arg leu leu ser gly ser lys glu lys asp arg ser leu arg arg ile thr arg

841/281 871/291  
 ATG GTG CTG GTG GTG GTG GGC GCC TTC GTG GTG TGC TGG GCG CCC ATC CAC ATC TTC GTC  
 met val leu val val val gly ala phe val val cys trp ala pro ile his ile phe val

901/301 931/311  
 ATC GTC TGG ACG CTG GTG GAC ATC AAT CGG CGC GAC CCA CTT GTG GTG GCC GCA CTG CAC  
 ile val trp thr leu val asp ile asn arg arg asp pro leu val val ala ala leu his

961/321 991/331  
 CTG TGC ATT GCG CTG GGC TAC GCC AAC AGC AGC CTC AAC CCG GTT CTC TAC GCC TTC CTG  
 leu cys ile ala leu gly tyr ala asn ser ser leu asn pro val leu tyr ala phe leu

1021/341 1051/351  
 GAC GAG AAC TTC AAG CGC TGC TTC CGC CAG CTC TGT CGC ACG CCC TGC GGC CGC CAA GAA  
 asp glu asn phe lys arg cys phe arg gln leu cys arg thr pro cys gly arg gln glu

1081/361 1111/371  
 CCC GGC AGT CTC CGT CGT CCC CGC CAG GCC ACC ACG CGT GAG CGT GTC ACT GCC TGC ACC  
 pro gly ser leu arg arg pro arg gln ala thr thr arg glu arg val thr ala cys thr

1141/381 1171/391  
 CCC TCC GAC GGC CCG GGC GGT GGC GCT GCC GCC TGA CCT ACC CGA CCT TCC CCT TAA ACG  
 pro ser asp gly pro gly gly gly ala ala ala \*

1201/401 1231/411  
 CCC CTC CCA AGT GAA GTG ATC CAG AGG CCA CAC CGA GCT CCC TGG GAG GCT GTG GCC ACC

1261/421 1291/431  
 ACC AGG ACA GCT AGA ATT GGG CCT GCA CAG AGG GGA GGC CTC CTG TGG GGA CGG GGC CTG

1321/441 1351/451  
 AGG GAT CAA AGG CTC CAG GTT GGA ACG GTG GGG GTG AGG AAG CAG AGC TGG TGA TTC CTA

1381/461 1411/471  
 AAC TGT ATC CAT TAG TAA GGC CTC TCC AAT GGG ACA GAG CCT CCG CCT TGA GAT AAC ATC

1441/481 1471/491  
 GGG TTC TGG CCT TTT TGA ACA CCC AGC TCC AGT CCA AGA CCC AAG GAT TCC AGC TCC AGG

1501/501 1531/511  
 AAC CAG GAG GGG CAG TGA TGG GGT CGA TGA TTT GGT TTG GCT GAG AGT CCC AGC ATT TGT

1561/521 1591/531  
 GTT ATG GGG AGG ATC TCT CAT CTT AGA GAA GAT AAG GGG ACA GGG CAT TCA GGC AAG GCA

Figure 12 (suite 1)

1621/541 1651/551  
GCT TGG GGT TTG GTC AGG AGA TAA GCG CCC CCT TCC CTT GGG GGG AGG ATA AGT GGG GGA

1681/561 1711/571  
TGG TCA ACG TTG GAG AAG AGT CAA AGT TCT CAC CAC CTT TCT AAC TAC TCA GCT AAA CTC

1741/581 1771/591  
GTT GAG GCT AGG GCC AAC GTG ACT TCT CTG TAG AGA GGA TAC AAG CCG GGC CTG ATG GGG

1801/601 1831/611  
CAG GCC TGT GTA ATC CCA GTC ATA GTG GAG GCT GAG GCT GGA AAA TTA AGG ACC AAC AGC

1861/621 1891/631  
CTG GGC AAT TTA GTG TCT CAA AAT AAA ATG TAA AGA GGG CTG GGA ATG TAG CTC AGT GGT

1921/641 1951/651  
AGG GTG TTT GTG TGA GGC TCT GGG ATC AAT AAG ACA AAA CAA CCA ACC AAC CAA AAA CCT

1981/661 2011/671  
TCC AAA CAA CAA AAC CAA CCC TCA AAC CAA AAA ACT ATG TGG GTG TCT CTG AGT CTG GTT

2041/681 2071/691  
TGA AGA GAA CCC GCA GCC CTG TAT CCC TGT GGG GCT GTG GAC AGT GGG CAG AAG CAG AGG

2101/701 2131/711  
CTC CCT GGA TCC TGA ACA AGG GCC CCA AAA GCA AGT TCT AAA GGG ACC CCT GAA ACC GAG

2161/721 2191/731  
TAA GCC TTT GTG TCA AGA AGT GGG AGT ACA ACC AGA AAG GTG GCT GAG TGC TTT AGA G

Figure 12 (suite 2)

## mKOR

1/1 31/11  
 GCA CCT TGC TGA TCC CAA ACA GGC AGA GCT TCT TCC AGT CTT GGA AGG CAC AAA TTG AGC  
 61/21 91/31  
 ATC AGG AAC GTG GAC CCA TCA GGG CTG AAC AGC TAC TCA GGA TCT AAA GTG GTG ACT TGG  
 121/41 151/51  
 AAA GCT GAC GGT GAC TTG GGA AGG GAG GTC GCC AAT CAG CGA TCT GGA GCT GCA GCG CTC  
 181/61 211/71  
 ACC ATG GAG TCC CCC ATT CAG ATC TTC CGA GGA GAT CCA GGC CCT ACC TGC TCT CCC AGT  
 met glu ser pro ile gln ile phe arg gly asp pro gly pro thr cys ser pro ser  
 241/81 271/91  
 GCT TGC CTT CTC CCC AAC AGC AGC TCT TGG TTC CCC AAC TGG GCA GAA TCC GAC AGT AAT  
 ala cys leu leu pro asn ser ser ser trp phe pro asn trp ala glu ser asp ser asn  
 301/101 331/111  
 GGC AGT GTG GGC TCA GAG GAT CAG CAG CTG GAG TCC GCG CAC ATC TCT CCG GCC ATC CCT  
 gly ser val gly ser glu asp gln gln leu glu ser ala his ile ser pro ala ile pro  
 361/121 391/131  
 GTT ATC ATC ACC GCT GTC TAC TCT GTG GTA TTT GTG GTG GGC TTA GTG GGC AAT TCT CTG  
 val ile ile thr ala val tyr ser val val phe val val gly leu val gly asn ser leu  
 421/141 451/151  
 GTC ATG TTT GTC ATC ATC CGA TAC ACG AAG ATG AAG ACC GCA ACC AAC ATC TAC ATA TTT  
 val met phe val ile ile arg tyr thr lys met lys thr ala thr asn ile tyr ile phe  
 481/161 511/171  
 AAC CTG GCT TTG GCA GAT GCT TTG GTT ACT ACC ACT ATG CCC TTT CAG AGT GCT GTC TAC  
 asn leu ala leu ala asp ala leu val thr thr thr met pro phe gln ser ala val tyr  
 541/181 571/191  
 TTG ATG AAT TCT TGG CCT TTT GGA GAT GTG CTA TGC AAG ATT GTC ATT TCC ATT GAC TAC  
 leu met asn ser trp pro phe gly asp val leu cys lys ile val ile ser ile asp tyr  
 601/201 631/211  
 TAC AAC ATG TTT ACC AGC ATA TTC ACC TTG ACC ATG ATG AGT GTG GAC CGC TAC ATT GCT  
 tyr asn met phe thr ser ile phe thr leu thr met met ser val asp arg tyr ile ala  
 661/221 691/231  
 GTG TGC CAC CCT GTG AAA GCT TTG GAC TTC CGA ACA CCT TTG AAA GCA AAG ATC ATC AAC  
 val cys his pro val lys ala leu asp phe arg thr pro leu lys ala lys ile ile asn  
 721/241 751/251  
 ATC TGC ATT TGG CTC CTG GCA TCA TCT GTT GGT ATA TCA GCG ATA GTC CTT GGA GGC ACC  
 ile cys ile trp leu leu ala ser ser val gly ile ser ala ile val leu gly gly thr  
 781/261 811/271  
 AAA GTC AGG GAA GAT GTG GAT GTC ATT GAA TGC TCC TTG CAG TTT CCT GAT GAT GAA TAT  
 lys val arg glu asp val asp val ile glu cys ser leu gln phe pro asp asp glu tyr  
 841/281 871/291  
 TCC TGG TGG GAT CTC TTC ATG AAG ATC TGT GTC TTC GTC TTT GCC TTT GTG ATC CCA GTC  
 ser trp trp asp leu phe met lys ile cys val phe val phe ala phe val ile pro val  
 901/301 931/311  
 CTC ATC ATC ATT GTC TGC TAC ACC CTG ATG ATC CTG CGC CTG AAG AGT GTC CGG CTC CTG  
 leu ile ile ile val cys tyr thr leu met ile leu arg leu lys ser val arg leu leu

Figure 13



961/321	991/331
TCT GGC TCC CGA GAG AAG GAC CGA AAT CTC	CGC CGC ATC ACC AAG CTG GTG CTG GTA GTA
ser gly ser arg glu lys asp arg asn leu	arg arg ile thr lys leu val leu val val
1021/341	1051/351
GTT GCA GTC TTC ATC ATC TGT TGG ACC CCC	ATT CAC ATC TTT ATC CTG GTG GAG GCT CTG
val ala val phe ile ile cys trp thr pro	ile his ile phe ile leu val glu ala leu
1081/361	1111/371
GGA AGC ACC TCC CAC AGC ACA GCT GCC CTC	TCC AGC TAT TAT TTC TGT ATT GCC TTG GGT
gly ser thr ser his ser thr ala ala leu	ser ser tyr tyr phe cys ile ala leu gly
1141/381	1171/391
TAT ACC AAC AGC AGC CTG AAT CCT GTT CTC	TAT GCC TTT CTG GAT GAA AAC TTC AAG CGG
tyr thr asn ser ser leu asn pro val leu	tyr ala phe leu asp glu asn phe lys arg
1201/401	1231/411
TGT TTT AGG GAC TTC TGC TTC CCT ATT AAG	ATG CGA ATG GAG CGC CAG AGC ACC AAT AGA
cys phe arg asp phe cys phe pro ile lys	met arg met glu arg gln ser thr asn arg
1261/421	1291/431
GTT AGA AAC ACA GTT CAG GAT CCT GCT TCC	ATG AGA GAT GTG GGA GGG ATG AAT AAG CCA
val arg asn thr val gln asp pro ala ser	met arg asp val gly gly met asn lys pro
1321/441	1351/451
GTA TGA CTA GTC GTG GAA ATG TCT TCT TAT	TGT TCT CCA GGT AGA GAA GAG TTC AAT GAT
val *	1381/461
CTT GGT TTA ACC CAG ATT ACA ACT GCA G	

Figure 13 (suite 1)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO 93 21309 A (LEE NANCY M ; LOH HORACE H (US); LIPPMAN DAVID (US)) 28 Octobre 1993 * le document en entier * ---	1
A	WO 96 01898 A (UNIV PASTEUR ; KIEFFER BRIGITTE (FR); SIMONIN FREDERIC (FR)) 25 Janvier 1996 * le document en entier * ---	1
A	WO 95 07983 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 23 Mars 1995 * le document en entier * ---	1
T	NATURE, vol. 383, no. 6603, 31 Octobre 1996, LONDON GB, pages 819-823, XP000613442 METTHES, H. ET AL.: "Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene" * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A01K C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 Février 1997		Chambonnet, F
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  .....  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1  
EPO FORM 1503 03.82 (P/MCI.3)