

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 juin 2006 (22.06.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/064115 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)

Boulevard de Saint Loup, F-13010 Marseille (FR).
PASCUSSI, Jean-Marc [FR/FR]; 168, rue Pica Talen,
F-34980 Saint Gely du Fesc (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/003099

(74) Mandataire : **SANTARELLI**; 14, avenue de la Grande-
Armée, BP 237, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(22) Date de dépôt international :
12 décembre 2005 (12.12.2005)

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
04 13423 16 décembre 2004 (16.12.2004) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
**UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (AIX-MAR-
SEILLE II)** [FR/FR]; 58, boulevard Charles Livon,
Jardin du Pharo, F-13007 Marseille (FR). **CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS)** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 PARIS
(FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR).

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **SEREE,
Pacha, Eric** [FR/FR]; 26 Boulevard Haguenau, F-13012
Marseille (FR). **VILLARD, Pierre-Henri** [FR/FR]; 22
rue Roux de Brignoles, F-13006 Marseille (FR). **BARRA,
Yves** [FR/FR]; Résidence Saint Loup, Bâtiment B, 103

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: USE OF NUCLEOTIDE SEQUENCES PREFERABLY INTERACTING WITH THE TRANSCRIPTION COMPLEX
PPAR α

(54) Titre : UTILISATION DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES INTERAGISSANT PREFERENTIELLEMENT AVEC LE
COMPLEXE DE TRANSCRIPTION PPAR α

(57) Abstract: The invention relates to the use of a polynucleotide comprising a sequence of formula (I): -TGACCTNOGGGCT-, where N = any natural or synthetic nucleotide base and O = A, T or U, where said sequence of formula (I) or a complement of (I) permits the selective interaction of said polynucleotide with one or more constituent elements of the transcription complex PPAR α . This use permits an evaluation of the PPAR transcription activity, the identification of novel ligands and sequences specific to PPAR α and the diagnosis and treatment of diseases related to a PPAR activity malfunction. The invention further relates to a vector comprising a polynucleotide as above, a cell transformed by said vector and kits for characterization of PPAR activity comprising said polynucleotide.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'un polynucléotide comprenant une séquence de formule (I): -TGACCT-NOGGGCT-, dans laquelle N représente n'importe quel base nucléotidique naturelle ou de synthèse et O représente une base A, T ou U, dans laquelle ladite séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) permet l'interaction sélective dudit polynucléotide avec un ou plusieurs éléments constitutifs du complexe de transcription PPAR α . Cette utilisation permet d'évaluer l'activité de transcription de PPAR, d'identifier de nouveaux ligands et séquences spécifiques de PPAR α , ainsi que diagnostiquer et traiter des maladies liées à une dérégulation de l'activité de PPAR. L'invention concerne en outre un vecteur comprenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus, une cellule transformée par ce vecteur, ainsi que des kits de caractérisation de l'activité de PPAR comprenant un tel polynucléotide.

WO 2006/064115 A1

Utilisation de séquences nucléotidiques interagissant
préférentiellement avec le complexe de transcription PPAR α

La présente invention concerne l'utilisation d'un polynucléotide comprenant une séquence de formule (I) : - TGACCTNOGGGCT- , dans laquelle N représente n'importe quel base nucléotidique naturelle ou de synthèse et O représente une base A, T ou U, caractérisée en ce que ladite

5 séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) permet l'interaction sélective dudit polynucléotide avec un ou plusieurs éléments constitutifs du complexe de transcription PPAR α .

PPAR (en anglais : "Peroxisome Proliferator Activated Receptor"), désigne une famille de facteurs de transcription appartenant à la classe des

10 récepteurs aux hormones stéroïdes. Les récepteurs aux hormones stéroïdes régulent l'expression de nombreux gènes dont ceux impliqués dans la différenciation cellulaire et dans le métabolisme énergétique de la cellule. En particulier, ils régulent des voies de signalisation essentielles à la vie cellulaire, en assurant un certain équilibre des taux de lipides et de glucides circulant dans

15 l'organisme [Berger J. and Moller DE (2002) Ann. Rev. Med. 53:409-35].

L'alimentation, ou plus précisément les nutriments peuvent modifier la transcription des gènes de différentes manières. Certains acides gras, tel l'acide linoléique, se lient directement aux facteurs de transcription en tant que ligands capable de réguler l'activité de PPAR. Certains glucides

20 agissent au contraire de manière indirecte *via* des intermédiaires hormonaux, comme par exemple la production d'insuline, qui modifie PPAR et active de ce fait la transformation du glucose en glycogène au niveau du foie par activation de l'expression de la glucokinase hépatique.

PPAR est présent dans le corps humain sous forme de plusieurs

25 structures protéiques. On distingue trois types de structures : PPAR alpha (foie, tractus digestif, reins...), PPAR gamma (tissu adipeux et macrophage...) et PPAR bêta ou delta (exprimés de façon ubiquitaire).

Les facteurs de transcription de type PPAR, pour exercer leur activité transactivatrice, agissent sous forme d'un complexe hétérodimérique

30 PPAR/RXR qui recrute d'autres protéines dont des co-activateurs. Sous

l'influence de ligands plus ou moins spécifiques, le complexe PPAR/RXR est activé. Le complexe PPAR/RXR se fixe sur des séquences d'ADN particulières, nommées PPRE (peroxysome proliferator activated receptor responsive element). Ces séquences font partie du promoteur des gènes cibles régulés par PPAR. La fixation de PPAR sur les séquences PPRE a pour effet de modifier la structure de la chromatine, ce qui déclenche la «machinerie transcriptionnelle», autrement dit la transcription en ARN des gènes cibles de PPAR.

Les séquences promotrices des gènes transcrits spécifiquement par les complexes PPAR α , PPAR γ ou indifféremment par PPAR α ou PPAR γ , sont qualifiées respectivement, dans le présent mémoire, de séquences PPRE α , PPRE γ ou PPRE α/γ (séquences capables d'interagir à la fois avec PPAR α et PPAR γ).

A ce jour, les séquences PPRE décrites dans les banques de données fixent indifféremment tous les isoformes de PPAR [Berger J. and Moller DE (2002) Ann. Rev. Med. 53:409-35]. La spécificité d'action semble donc provenir essentiellement du ligand, du taux d'expression tissulaire des différentes composantes du complexe de transcription et de celui de ses éventuels partenaires (co-activateurs, co-répresseurs...).

Des ligands permettant d'activer préférentiellement les complexes de transcription PPAR α et PPAR γ , d'origines synthétiques ou naturelles, ont pu être identifiés et utilisés en tant qu'hypolipémiants et hypoglycémiants dans le traitement de certaines maladies métaboliques telles que les hypertryglycériémies et le diabète de type II. [Kersten S, Desvergne B, Wahle W (2000) Nature 405 :421-4]. On peut ainsi citer les ligands suivants:

- PPAR α : fibrates tels que le fénofibrate et le bésafibrate (ligands de synthèse);
- PPAR γ : thiazolidinediones, telles que la rosiglitazone et la troglitazone (ligands de synthèse);

En outre, certains polluants environnementaux, tels que les phtalates, les pesticides dérivés de l'acide phénoxyacétique, ont été identifiés pour être des ligands potentiels de facteurs de transcription de type PPAR [Maloney EK, Waxman DJ (1999) Toxicol. Appl. Pharmacol. 161:209-18].

L'identification de telles substances revêt donc une certaine importance dans le domaine de la toxicologie.

Concernant les ligands synthétiques de PPAR, il est essentiel de savoir si une nouvelle molécule en cours de développement est un agoniste spécifique de PPAR α , PPAR γ , ou PPAR α et PPAR γ . En effet, on considère à l'heure actuelle dans l'industrie pharmaceutique que les molécules à la fois agonistes de PPAR α et de PPAR γ pourraient être d'un intérêt thérapeutique majeur puisqu'elles diminueraient d'une part le taux de triglycérides circulant (activation de PPAR α) et d'autre part la résistance périphérique à l'insuline (activation de PPAR γ). De telles molécules pourraient s'opposer aux deux perturbations métaboliques majeures rencontrées, par exemple, dans le diabète de type II. Cependant, les premières molécules testées possédant ces propriétés présentent une toxicité trop importante.

A ce jour, pour évaluer quel est le ou les isoformes de PPAR mis en jeu dans la réponse pharmaco-toxicologique d'une nouvelle molécule en développement, il est nécessaire de mettre en œuvre toute une série d'expérimentations telles que :

- Microarrays ou puces à ADN
- Expériences de liaison (en anglais : "binding")
- Techniques de Gènes rapporteurs utilisant la séquence PPRE canonique...

La technique des puces à ADN, permet de déterminer quels sont les gènes affectés après exposition à une molécule donnée. Après extraction des ARNm, ceux ci sont transformés en ADNc marqués. Ces derniers sont mis en contact sur une puce où ont été fixées des cibles spécifiques d'un certain nombre de gènes. Cette technique a pour avantage de s'adapter au screening, par contre elle demeure coûteuse et ne permet de mettre en évidence que des actions marquées (facteur deux d'induction ou d'inhibition) sans toute fois accéder à une connaissance des mécanismes moléculaires sous-jacents.

Les expériences de liaison (en anglais : "binding"), quelle que soit la méthodologie utilisée, permettent d'analyser la fixation d'une molécule sur sa cible moléculaire et de déterminer son affinité. Ces expériences bien qu'applicables au screening, ne permettent pas de déterminer si la molécule se

comporte comme un agoniste, un agoniste inverse, un agoniste antagoniste ou au contraire un antagoniste de la cible.

Les techniques de gènes rapporteurs consistent à évaluer l'activité régulatrice d'une séquence nucléique par son action sur l'expression d'un gène dit rapporteur. Ce gène rapporteur, n'est pas exprimé dans l'organisme étudié et son expression est facilement analysable et quantifiable. Cette technologie permet de savoir si une nouvelle molécule active la séquence étudiée. En revanche, elle ne permet pas de connaître spécifiquement le facteur de transcription impliqué.

Toutes ces expériences prises isolément n'apportent aucune information directe sur la spécificité d'action que le nouveau ligand est capable de conférer à PPAR.

Les mécanismes par lesquels les ligands sont capables de conférer une spécificité aux complexes de transcription PPAR restent largement inexpliqués.

Les séquences promotrices des gènes transcrits par PPAR sont pour la plupart connues et répertoriées [base de données GeneCards : <http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml>]. Cependant, il est apparu que ces éléments ne permettaient pas la différenciation des complexes de transcription PPAR α et PPAR γ .

Les inventeurs dans le cadre de la présente invention sont allés plus loin et se sont intéressés à des domaines secondaires des régions promotrices, distincts des éléments caractéristiques mentionnés ci-dessus.

De manière inattendue, les inventeurs ont identifié de courtes séquences d'ADN dont le consensus est donné par la formule (I) - TGACCTNOGGGCT-, dans laquelle N représentant n'importe quelle base nucléotidique et O représentant une base A, T ou U, lesquelles séquences sont capables d'interagir plus spécifiquement avec le complexe de transcription PPAR α , qu'avec le complexe PPAR γ .

Il est même apparu que ces courtes séquences étaient essentielles à la transcription de certains gènes cibles de PPAR α , et qu'elles pouvaient être utilisées pour discriminer l'activité de transcription du complexe

PPAR α par rapport à PPAR γ .

Sur la base de ces résultats, il est apparu que des polynucléotides incluant la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) tels que décrits ci-après, pouvaient être utilisés dans des procédés et des kits permettant de caractériser l'activité de transcription de PPAR. Ces utilisations permettent en particulier d'identifier de nouveaux composés (séquences d'ADN ou ligands) capables d'interagir avec PPAR, et améliorent ainsi le diagnostic et le traitement des maladies métaboliques liées à une modification de l'activité de PPAR.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'un polynucléotide comprenant

i) une séquence de formule générale (I) :

- TGACCTNOGGGCT-

15

dans laquelle A, C, G et T désignent respectivement les bases adénine, cytosine, guanine et thymine, N représente une base nucléotidique naturelle ou synthétique quelconque et O représente une base qui est A (adénine), T (thymine) ou U (uracile); ou

ii) une séquence complémentaire de (I) telle que définie sous i), ladite séquence (I) ou complémentaire de (I) permettant l'interaction sélective dudit polynucléotide avec un ou plusieurs éléments constitutifs du complexe de transcription PPAR α , ladite utilisation a pour but d'évaluer directement l'activité de transcription de PPAR, en particulier lorsqu'il se trouve sous la forme PPAR α , et indirectement l'activité de transcription de PPAR γ .

On entend par activité de transcription le fait que la séquence codante d'un gène soit transcrite sous forme d'ARN. Dans le cas présent, la transcription s'effectue grâce à un complexe de transcription, lequel comprend le facteur de transcription PPAR associé à un certain nombre d'éléments annexes constitutifs, tels que des protéines auxiliaires et des ligands. Ces éléments annexes déterminent la spécificité, voire la sélectivité, du complexe

de transcription.

PPAR α correspond à une isoforme de la famille PPAR. Celui-ci a la capacité d'activer, au sein du complexe de transcription PPAR α , la transcription d'un ensemble de gènes qualifiés de "gènes sous contrôle de PPAR α ".

Une séquence de formule (I) préférée selon l'invention est celle présentée dans le présent mémoire sous la référence SEQ ID N°1

(SEQ ID N°1) 5' TGACCTCAGGGCT 3'

Un polynucléotide est utilisable selon l'invention également lorsqu'il comprend la séquence inverse complémentaire de (I) dans les deux orientations possibles (5'→3' ou 3'→5'), c'est le cas par exemple la SEQ ID N°2 suivante qui est la séquence complémentaire inverse de SEQ ID N°1 :

(SEQ ID N°2) 5' AGCCCTGAGGTCA 3'

De manière préférentielle, on utilisera aux fins de l'invention un polynucléotide correspondant à l'une des séquences nucléotidiques suivantes

GGCCTTCCGGCCCCGTGACCTCAGGGCTGGGGTCGCAG (SEQ ID N°3)

CCGGAAGGCCGGGGCACTGGAGTCCCGACCCCAGCGTC (SEQ ID N°4)

GGCCTTCCGGCCCCGTGACCTCTGGGCTGGGGTCGCAG (SEQ ID N°5)

CCGGAAGGCCGGGGCACTGGAGACCCGACCCCAGCGTC (SEQ ID N°6)

TCCGGCCCCGTGACCTCAGGGCTGGGGTCGCAG (SEQ ID N°7)

AGGCCGGGGCACTGGAGTCCCGACCCCAGCGTC (SEQ ID N°8)

TCCGGCCCCGTGACCTCTGGGCTGGGGTCGCAG (SEQ ID N°9)

AGGCCGGGGCACTGGAGACCCGACCCCAGCGTC (SEQ ID N°10)

GGCCTTCCGGCCCCGTGACCTCAGGGCTGGGGTCGCAGC (SEQ ID N°17)

GCTGCGACCCCAGCCCTGAGGTCACGGGGCCGGAAGGCC (SEQ ID N°18)

On entend par "interaction sélective" le fait qu'un rapprochement physique de la séquence d'ADN de formule (I) avec un ou plusieurs éléments du complexe de transcription PPAR, permet une modulation de la transcription affectant exclusivement la transcription des gènes habituellement régulés par PPAR α .

On parle également d'interaction sélective lorsqu'un polynucléotide tel que défini ci-dessus se fixe avec ou retient physiquement directement ou indirectement un ou plusieurs éléments constitutifs du complexe de transcription PPAR α , ou un ligand de celui-ci.

Certaines expériences ont permis d'établir que la séquence de formule (I), en particulier SEQ ID N°1, agissait en tant qu'élément de type "enhancer", c'est-à-dire un élément permettant d'augmenter l'intensité de la transcription via PPAR. Ce type d'élément interagit positivement avec un ou plusieurs éléments fonctionnels du complexe de transcription et ce indépendamment de sa localisation précise par rapport au site d'initiation de la transcription.

La séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) peut ainsi se trouver ou être insérée théoriquement à n'importe quel endroit d'un polynucléotide, quelque soit sa taille et son orientation. Le polynucléotide selon l'invention peut être un ADN mono brin ou pluricaténaire. En général, un polynucléotide selon l'invention compte au moins 13 nucléotides, de préférence au moins 20, et plus préférentiellement au moins 30 nucléotides.

Un polynucléotide utilisable selon l'invention peut comprendre, en plus de la séquence de formule (I) et complémentaire de (I), d'autres séquences nécessaires à la mise en évidence d'une activité de transcription [Biologie Moléculaire et Médecine, Kaplan JC et Delpech M, Ed Médecine-Sciences Flammarion ISBN : 2-257-12488-X], tel qu'un site d'initiation de la transcription (promoteur basique).

Ainsi, le polynucléotide dont l'utilisation est décrite plus haut, peut comprendre, en plus de la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I), une séquence supplémentaire de type PPRE, c'est-à-dire une séquence d'ADN capable d'interagir avec un complexe de transcription de type PPAR, en

particulier une séquence de type PPRE α ou PPRE α/γ .

Ledit polynucléotide peut également comprendre, la séquence d'un gène dont la transcription est habituellement placée sous le contrôle de PPAR, ou bien seulement la séquence promotrice de ce gène.

5 Ledit polynucléotide peut également comprendre la séquence d'un gène rapporteur. La transcription de la séquence codante dudit gène rapporteur peut, selon les cas, se trouver placée sous contrôle d'une séquence de type PPRE α ou PPRE α/γ ou bien en fusion avec le promoteur d'un gène sous contrôle de PPAR α , PPAR γ ou PPAR α/γ .

10 Selon une utilisation préférée de l'invention, la transcription de la séquence codante du gène rapporteur se trouve sous contrôle total ou partiel d'un polynucléotide comprenant une séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) telle que décrite précédemment.

En général, le complexe de transcription PPAR interagit avec la
15 séquence (I) ou complémentaire de (I) en présence d'un ligand spécifique de celui-ci.

De préférence la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) se trouve à une distance comprise entre 40 et 300 paires de bases, plus préférentiellement entre 50 et 150, en amont d'un site d'initiation de la
20 transcription.

La séquence de formule (I) et/ou complémentaire de (I) peut être insérée dans la partie promotrice d'un gène afin que la transcription de ce gène soit placée sous contrôle du complexe PPAR α . La séquence promotrice du gène acquiert dans ce cas les propriétés d'une séquence de type PPRE α .

25 Un autre objet de l'invention consiste en un vecteur d'expression comprenant au moins une séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) telle que définie précédemment et un gène rapporteur.

Un autre objet de l'invention consiste en une cellule hôte transformée à l'aide d'un des vecteurs définis ci-dessus. Une telle cellule hôte
30 peut servir de système biologique d'évaluation qualitative et quantitative de l'activité de transcription de PPAR.

Les gènes rapporteurs utilisés, selon la cellule hôte choisie pour

leur expression, peuvent être par exemple:

- le gène de la Chloramphénicol Acétyl Transférase;
- le gène de la Luciférase;
- le gène de la Green Fluorescent Protein;
- 5 - le gène de la β -galactosidase;
- Le gène SEAP (SEcreted Alkaline Phosphatase);
- Le gène ZsGreen;
- Le gène GAL 4 (dans le cas d'un système indirecte GAL4-UAR dans des cellules eucaryotes)

10 Parmi les vecteurs pouvant être employés aux fins de transférer ce système rapporteur dans des cellules procaryotes ou eucaryotes, on peut citer:

- des plasmides tel que psG3, psG5, pBLCAT2, pCATpromoter, pSEAP2-control, pEGFP-1, pHRed1-1, pECFP-1, pCMV-DsRed-Express
- 15 - des phages tel que le phage lambda;
- des adénovirus tel que pDNR-CMV, pShuttle2 ou pTRE-Shuttle2;
- des rétrovirus tel que Plp-LNCX...

 Différents modèles cellulaires peuvent être envisagés en tant que cellules hôtes. Certaines cellules comme les procaryotes et les levures
20 n'expriment pas naturellement PPAR et RXR. Il est donc nécessaire, au préalable, de les transformer avec les ADNc codant pour PPAR et RXR. Les bactéries pouvant être utilisées à cet effet sont par exemple deux clones d'*Escherichia coli* BL21 et JM83, et, pour ce qui concerne les levures, divers clones de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 Certains insectes expriment RXR (gène Usp) mais pas PPAR, il est donc nécessaire dans ce cas de les transférer avec les ADNc codant pour PPAR. Parmi les cellules d'insectes pouvant convenir, on peut citer par exemple, les lignées cellulaires de *Drosophila melanogaster* S2 et Sf21.

 Les cellules de mammifères, notamment de rongeurs
30 (préadipocyte murin 3T3-L1...), expriment à la fois PPAR α et RXR α . Cependant, la spécificité de ligand pour PPAR peut varier en fonction des espèces. Il faudra donc au préalable la vérifier, avant d'extrapoler les résultats à

l'homme.

Les cellules d'origine humaine sont des hôtes de choix, notamment celles exprimant à des taux importants PPAR α telles que les adipocytes (cellules en culture primaire...) et les entérocytes (CaCo-2, HT29...).

- 5 La transfection de ces cellules par de l'ADNc codant pour PPAR α permet d'augmenter la sensibilité. Dans le cadre d'une application pour le criblage haut débit, il est recommandé d'utiliser préférentiellement des cellules adhérentes cultivées dans des plaques multi-puits.

- 10 Un polynucléotide utilisable selon l'invention peut être obtenu de différente manière. A l'origine, la séquence SEQ ID N°1 a été caractérisée à partir d'un gène humain. Les polynucléotides selon l'invention peuvent cependant être reproduits par synthèse chimique directe et programmée ou bien clonés dans un vecteur afin d'être répliqué dans une cellule hôte transformée. Un autre moyen d'obtenir un polynucléotide selon l'invention est
- 15 d'amplifier une séquence PPRE α d'intérêt par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) à partir d'une préparation d'ADN.

- La présente invention, se base sur les propriétés d'interaction particulières que possède la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) pour le complexe PPAR α , en particulier des propriétés de liaison physique. Ces
- 20 propriétés non décrites auparavant permettent de caractériser une activité de transcription de type PPAR, et plus particulièrement permettent de discriminer une activité de transcription de type PPAR α par rapport à PPAR γ .

- Une utilisation selon l'invention permet ainsi de différencier une activité de transcription de type PPAR α , en présence d'autres types d'activité
- 25 transcriptionnelle.

- Une utilisation selon l'invention permet ainsi de détecter une activité de transcription de type PPAR α dans un milieu biologique donné. Cela permet en outre de pouvoir caractériser de nouvelles séquences de type PPRE, lesquelles peuvent avoir été identifiées, par exemple, dans une préparation
- 30 d'ADN génomique.

L'évaluation de l'activité de transcription de PPAR peut être réalisée selon l'invention, suivant différentes modalités décrites ci-après:

Un polynucléotide tel que décrit plus haut est utilisable selon l'invention en tant que sonde d'hybridation, par exemple, dans le but de détecter de nouvelles séquences PPRE dans une préparation d'ADN, contenant en particulier de nouvelles séquences PPRE α .

5 De même, un polynucléotide tel que décrit plus haut peut être utilisé selon l'invention pour diagnostiquer des anomalies génétiques pouvant être à l'origine de maladies métaboliques, en particulier de maladies liées à une dérégulation de l'expression de gènes sous contrôle de PPAR, et plus particulièrement de maladies liées à une modification de l'activité
10 transcriptionnelle de PPAR, telle que l'hypertryglycémie, le diabète de type II ou des lipodystrophies.

Un polynucléotide tel que défini plus haut peut être utilisé pour doser un complexe de transcription PPAR, de préférence PPAR α , ou un de ses éléments constitutifs, dans un échantillon biologique, en utilisant plus
15 particulièrement les propriétés d'adhésion rencontrées entre ledit complexe et la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I). Le dosage peut s'effectuer de la manière suivante:

- 1) fixation sur une phase solide d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1;
- 20 2) mise en contact d'un échantillon dans lequel PPAR α ou un élément constitutif du complexe PPAR α est à quantifier;
- 3) quantification de PPAR α ou de l'élément constitutif du complexe PPAR α retenu par lesdits polynucléotides par une méthode d'analyse conventionnelle.

25 Par "méthode conventionnelle d'analyse", on entend une méthode usuelle connue de l'homme du métier, lui permettant de déterminer la quantité et le degré de pureté des composés fixés par le polynucléotide de l'invention, telle que, par exemple la chromatographie d'affinité.

Plusieurs types de supports solides peuvent être envisagés tels
30 que des microplaques, des billes magnétiques ou en polystyrène, des microparticules, des gels de chromatographie.

Une technique de fixation préférée consiste à fixer les

polynucléotides sur une microplaque à l'aide une liaison streptavidine/biotine.

Selon les conditions expérimentales, il est possible de retenir des composés capables de se lier avec le polynucléotide de l'invention.

Une élution dans les conditions adaptées, permet la récupération
5 des fractions les plus spécifiques et leur purification en vue d'identifier de nouveaux composés capables de prendre part potentiellement au complexe de transcription PPAR.

Plus particulièrement, un polynucléotide tel que défini plus haut
peut être utilisé pour identifier un ligand capable d'activer ou d'inhiber
10 sélectivement le complexe de transcription PPAR α .

L'invention peut consister, par exemple, en un procédé permettant
de mettre en évidence une interaction physique entre des facteurs de
transcription et un polynucléotide tel que décrit plus haut. Ce procédé selon
l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 15 1) marquage d'un polynucléotide utilisable selon l'invention;
2) mise en contact de PPAR α /RXR et du polynucléotide marqué
3) détection des complexes moléculaires formés autour du polynucléotide
marqué à l'aide de méthodes conventionnelles d'analyse, telles que, par
exemple, le retard sur gel, ou bien à l'aide d'un Kit selon l'invention, décrit plus
20 loin.

Inversement la protéine PPAR α peut être marquée, ainsi que les
molécules qui lui sont associées afin de caractériser des séquences de type
PPRE. L'invention peut alors consister en un procédé de détermination de la
spécificité d'une séquence nucléotidique de type PPRE, caractérisé en ce qu'il
25 comprend les étapes suivantes:

- 1) marquage du complexe formé par les protéines PPAR-RXR;
2) mise en contact du complexe PPAR-RXR marqué avec un polynucléotide tel
que défini dans l'invention fixé sur un support;
3) ajout dans la phase libre d'une concentration de la séquence nucléotidique
30 de type PPRE dont on cherche à déterminer la spécificité;
4) détection des complexes moléculaires formés autour du complexe PPAR-
RXR marqué.

Le marquage du polynucléotide, de PPAR (ou des protéines associées à PPAR), aux fins de la détection, peut être radioactif (32P, 33P...), immuno-enzymatique (sondes froides...), chimique (Bromure d'éthidium...) ou être encore réalisé selon toute autre technique connue de l'homme du métier.

5 On considère ici qu'un composé est susceptible d'interférer avec l'activité de transcription de PPAR lorsqu'il se lie à la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) ou bien lorsqu'il se lie à un des éléments constitutifs du complexe de transcription de PPAR.

10 Une méthode conventionnelle préférée pour évaluer les complexes formés autour de PPAR est la technique de retard sur gel, (en anglais EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay) [Biologie Moléculaire et Médecine, Kaplan JC et Delpech M, Ed Médecine-Sciences Flammarion ISBN : 2-257-12488-X].

15 La technique de gel retard consiste à faire migrer en électrophorèse les complexes formés ou non entre les facteurs de transcription et les séquences d'ADN cible, de sorte à pouvoir les comparer en fonction de leur distance électrophorétique sur un gel. Cette technique est utilisée idéalement pour des polynucléotides de 15 à 80 nucléotides, de préférence entre 20 et 50 nucléotides. La présence d'un site PPRE α unique et un micro
20 environnement permet de minimiser au maximum les interférences possibles avec d'autres facteurs de transcription.

 Il est possible, pour améliorer un des procédés décrits ci-dessus, de pratiquer, en outre, des tests immunologiques, et notamment d'utiliser des anticorps anti-PPAR α . Ces tests permettent de confirmer la nature des
25 éléments interagissant avec les polynucléotides utilisables selon l'invention.

 Pour l'ensemble des procédés décrits ci-dessus, il est recommandé d'utiliser en tant que témoin un polynucléotide, dans lequel la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) a été mutée ou a subi une délétion.

30 Un polynucléotide témoin selon l'invention peut consister, par exemple, en les séquences SEQ ID N°11, SEQ ID N°12, SEQ ID N°19 et SEQ ID N°20.

De même, il peut être utile d'utiliser à titre de comparaison des polynucléotides présentant une spécificité différente pour le complexe PPAR, consistant, par exemple, en des séquences de type PPRE γ ou PPRE α/γ .

Les propriétés d'activation de la transcription conférées par la
5 séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) permettent d'évaluer l'activité de transcription de PPAR, plus particulièrement de PPAR α , en présence de certains composés ou mélange de composés.

L'invention peut ainsi consister en un procédé de mise en évidence, via une cellule-hôte, de composés capables d'augmenter ou de
10 diminuer l'activité de transcription de PPAR α , consistant à placer un gène rapporteur sous le contrôle d'une ou plusieurs séquences PPRE, en particulier PPRE α et de comparer les profils d'expression obtenus en présence de différents composés ou mélange de composés. Cette technique permet, par exemple, de tester l'incidence d'un composé ou d'un mélange de composés sur
15 l'interaction de PPAR sur lesdites séquences de type PPRE.

L'invention peut également consister à mettre en évidence des composés capables d'augmenter ou de diminuer l'activité de transcription de PPAR α à l'aide d'un système d'expression comprenant un gène rapporteur. Ce procédé consiste en les étapes suivantes :

- 20 1) transformation d'une cellule hôte à l'aide d'un polynucléotide utilisable selon l'invention comprenant une séquence PPRE α et un gène rapporteur;
- 2) mise en culture de la cellule hôte obtenue à l'étape 1);
- 3) mise en contact de la cellule hôte cultivée à l'étape 2) avec le composé ou le mélange de composés à tester;
- 25 4) détection de l'expression du gène rapporteur.

De préférence, le gène rapporteur est placé sous le contrôle de PPAR α , mais il est possible également d'utiliser un système à deux composants de type GAL4/UAR dans lequel le gène rapporteur est indirectement placé sous le contrôle de PPAR α .

30 L'expression du gène rapporteur est détecté selon la technique la mieux adaptée (dosage enzymatique, quantification de protéine, dosage immunologique etc...), en fonction de la nature du produit exprimé. Selon que le

niveau d'expression du gène rapporteur est élevé ou faible, il est établi si le composé ou le mélange de composé exerce une influence positive ou négative sur le complexe PPAR et si cette influence présente un caractère sélectif, par exemple, vis-à-vis de PPAR α .

5 En complément de ce procédé, une cellule hôte témoin peut être transformée à l'aide d'un polynucléotide de contrôle tel que défini précédemment, incapable d'interagir avec PPAR, du fait que la séquence de formule (I) a été mutée, ou a subi une délétion. Il est alors possible de comparer les résultats obtenus entre la cellule hôte témoin et la cellule hôte sensible à
10 PPAR α .

Un tel procédé comprend les étapes suivantes:

- 1) transformation d'une cellule hôte à l'aide d'un polynucléotide utilisable selon l'invention comprenant une séquence PPRE α et un gène rapporteur;
- 2) transformation d'une cellule hôte témoin à l'aide d'un polynucléotide témoin tel
15 que défini plus haut, c'est-à-dire un polynucléotide utilisable selon l'invention, dans lequel la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) a été mutée ou a subi une délétion;
- 3) mise en culture des cellules hôtes obtenues aux étapes 1) et 2);
- 4) mise en contact des cellules hôtes cultivées avec le composé ou le mélange
20 de composés à tester;
- 5) détection de l'expression du gène rapporteur;

Il est en outre possible de moduler une activité de transcription de manière hétérologue en insérant un polynucléotide utilisable selon l'invention au niveau du promoteur d'un gène dans un vecteur ou bien un organisme
25 transgénique, Cette insertion doit permettre de placer la transcription dudit gène sous le contrôle du complexe PPAR α . La séquence promotrice ainsi créée présente alors les caractéristiques principales d'une séquence de type PPRE α telle que définie plus haut.

Il est à noter que les polynucléotides correspondants à SEQ ID
30 N°7, 8, 9 et 10 sont utilisés plus préférentiellement pour les procédés de retard sur gel ou utilisant un support solide et que les polynucléotides correspondants à SEQ ID N°3, 4, 5 et 6 sont utilisés plus préférentiellement pour les procédés

décrits ci-dessus utilisant un gène rapporteur.

Un autre aspect de l'invention consiste en un kit utilisant les propriétés d'interaction entre les polynucléotides tels que décrits plus haut et le complexe PPAR, en particulier PPAR α , permettant notamment de caractériser les interactions entre des séquences polynucléotidiques de type PPRE et les complexes de transcription de type PPAR.

Un kit selon l'invention utilise au moins un polynucléotide tel que défini dans l'invention, et de manière optionnelle, à une ou plusieurs séquences polynucléotidiques de type PPRE γ et PPRE α/γ , permettant ainsi de comparer de manière simultanée les différents types d'interactions pouvant exister entre les différents types de séquences de type PPRE et PPAR.

Le principe général d'un kit selon l'invention est de mettre en contact les polynucléotides précités avec une préparation de protéines purifiées PPAR et RXR, puis de détecter les complexes formés préférentiellement entre lesdites protéines et les séquences polynucléotides définies plus haut.

Selon un mode préféré de kit selon l'invention, les polynucléotides sont fixés sur un support pouvant se présenter, pour les besoins du criblage haut débit, sous la forme de puits, de tube ou de billes.

Selon un autre mode préféré au moins une des protéines PPAR et RXR ou séquence nucléotidique présente dans le kit peut être marquée pour les besoins d'une détection des complexes d'interaction formés.

On entend par "complexe d'interaction" l'ensemble formé par le complexe de transcription PPAR et le polynucléotide auquel il se trouve fixé (PPAR+PPRE).

Une variante préférée d'un kit selon l'invention consiste en un kit de criblage haut débit permettant de mettre en évidence la fixation d'un ligand spécifique de PPAR.

Selon une variante du kit, les polynucléotides fixés sur un support et les protéines PPAR-RXR sont mises en contact en présence d'un substrat spécifique marqué du complexe PPAR α , PPAR γ ou PPAR α/γ . On entend par substrat spécifique une molécule chimique naturelle ou de synthèse qui est connue comme étant ligand d'un ou de plusieurs des membres de la famille

PPAR.

Lorsque les complexes d'interaction PPAR-PPRE et le substrat spécifique marqué se sont formés, une molécule à tester, de préférence un ligand potentiel de PPAR, est introduite dans le milieu réactionnel. Si cette

5 molécule est de nature à agir en tant que ligand d'une forme particulière de PPAR, comme PPAR α , il se produit alors un déplacement par la molécule à tester de l'équilibre de liaison existant entre le substrat spécifique marqué et les protéines PPAR-RXR au sein du milieu réactionnel. La quantification de la molécule marquée dans la phase libre ou liée du système reflète le degré

10 d'interaction de la molécule à tester avec le complexe PPAR/RXR.

Selon une autre variante du kit, l'activité de PPAR peut être déterminée, par exemple, dans un extrait de protéines extraites du noyau d'une cellule préalablement traitée. Les protéines PPAR et RXR sont mises en contact avec au moins un polynucléotide, comme précédemment décrit (PPAR

15 ou RXR étant de préférence marquée), dans les conditions permettant la fixation de PPAR-RXR sur les séquences des polynucléotides, plus particulièrement une séquence de formule (I) ou complémentaire de (I). Différentes dilutions de l'extrait de protéines nucléaires à tester sont alors incubées en présence des complexes d'interaction formés. Selon que les

20 protéines contenues dans l'extrait sont capables de se lier à une séquence nucléotidique de type PPRE, comme par exemple PPRE α , il se produit ou non un déplacement partiel ou total du complexe PPAR/RXR marqué vers les séquences de formule (I). La quantification du marquage libre ou lié permet d'indiquer si l'extrait nucléaire contient des PPAR capables de se fixer sur une

25 séquence particulière PPRE, telle PPRE α .

Selon une autre variante du kit, il est possible d'établir si une séquence PPRE est de type PPRE α , PPRE γ ou PPRE α/γ . Des séquences PPRE de spécificité connue, telles que des polynucléotides comprenant une séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) sont mises en contact avec

30 une préparation de protéines PPAR-RXR préalablement marquées, de sorte à former des complexes PPRE/PPAR-RXR. La séquence PPRE potentielle dont on cherche à tester la spécificité est alors ajoutée dans le milieu réactionnel. Le

principe est de mettre la séquence PPRE de spécificité inconnue en compétition avec les séquences de PPRE de spécificité connue, dans leur liaison avec PPAR. Si l'affinité des protéines PPAR-RXR pour la séquence PPRE testée dans le milieu est importante, l'équilibre de liaison initial apparu, par exemple, entre le complexe PPAR α et les polynucléotides de type PPRE α se modifie. Il est dans ce cas établi, que la séquence PPRE présente une affinité supérieure ou équivalente pour PPAR α à la séquence connue de type PPRE α utilisée.

Comme pour les autres variantes du kit, le marquage d'une des protéines du kit permet de détecter les modifications au sein des complexes d'interaction.

Ainsi, un kit selon l'invention comprend généralement au moins :

- une préparation d'au moins un polynucléotide utilisable selon l'invention, liant sélectivement PPAR α ;
- une préparation des protéines purifiées PPAR-RXR dont un des membres au moins est marqué;
- un moyen de détection des complexes moléculaires marqués

On entend par moyen de détection des complexes d'interaction toute possibilité technique permettant de mettre en évidence une variation des interactions entre les polynucléotides utilisés et les protéines PPAR-RXR et entre les protéines PPAR-RXR et un ligand . Cette possibilité technique passe, par exemple, par la fourniture dans le kit de molécules marquées radioactivement ou chimiquement, de substrats, de réactifs ou d'enzymes permettant de révéler le marquage des molécules présentes dans les complexes d'interaction, de produits permettant la séparation physique des molécules tels que des gels d'électrophorèse, des gels de chromatographie, des billes magnétiques ou des réactifs de précipitation.

Un kit selon l'invention peut comporter en outre un polynucléotide témoin tel que défini plus haut dans lequel la séquence de formule (I) est mutée ou a subi une délétion, ainsi que des séquences de type PPRE γ ou de type PPRE α/γ , utiles à la caractérisation de l'activité du complexe de transcription de type PPAR.

Un kit selon l'invention peut comprendre, en outre, un moyen de support des polynucléotides précités, tels que des cupules, des puits, des tubes ou des billes.

- 5 Un kit selon l'invention peut comprendre également un ou plusieurs substrats spécifiques des différents isoformes de PPAR et/ou de RXR, et différentes séquences spécifiques ou non des différents isoformes de PPAR.

- 10 Selon un autre aspect de l'invention, un polynucléotide tel que défini plus haut peut encore être utilisé pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie métabolique, plus particulièrement une maladie liée à une modification de l'activité de PPAR, telle que l'hypertryglycémie et le diabète de type II ou des lipodistrophies. Un tel médicament peut comprendre, en particulier des polynucléotides utilisables
15 selon l'invention en tant qu'ADN anti-sens ou sous la forme de siRNA (une structure dite en épingle à cheveu sera alors recommandée), ayant pour effet d'inhiber l'interaction de PPAR avec la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) ou bien servir de leurre pour PPAR α .

- 20 Les figures et exemples qui suivent ont pour but d'illustrer l'invention, ils ne sauraient constituer une quelconque limitation des revendications.

FIGURE 1:

- 25 Comparaison de séquence PPRE α entre diverses espèces (rat, homme, souris). Il s'agit des séquences promotrices du gène CYP1A1 séquencées chez le rat, l'homme et la souris. Chacun de ces promoteurs comprennent une séquence de formule (I) indiquée en gras. Ces résultats montrent que les séquences de formule (I) ont été conservées d'une espèce à l'autre au cours de l'évolution.

30

FIGURE 2:

Procédé de mise en évidence d'un composé activant

spécifiquement le complexe de transcription PPAR. Le procédé consiste à transformer une cellule hôte apte à exprimer un gène rapporteur avec un vecteur comprenant ledit gène rapporteur placé sous la dépendance d'un promoteur PPAR-dépendant (construction N°2) ou bien d'un promoteur PPAR α -dépendant comprenant un polynucléotide selon l'invention (construction N°1). Les résultats obtenus à l'aide des constructions N°1 et N°2 selon la spécificité du ligand testé (PPAR α ou PPAR α/γ) sont rapportés dans le tableau 1 ci-dessous. La molécule X1 exerce son action via PPAR α et/ou PPAR γ (absence de sélectivité du ligand X1) contrairement à la molécule X2 qui agit uniquement via PPAR γ (sélectivité du ligand pour PPAR γ).

Construction	Traitement	Gène rapporteur
N°1	Ligand de PPAR α	+++
N°2	Ligand de PPAR α	+++
N°1	Ligand de PPAR γ	-
N°2	Ligand de PPAR γ	+++
N°1	X1	+++
N°2	X1	+++
N°1	X2	-
N°2	X2	+++

FIGURE 3:

Effet d'un ligand de PPAR α ou PPAR γ sur l'induction de l'expression du gène CAT. Le promoteur d'un gène contenant à la fois les sites PPRE α et PPRE consensus (α/γ) a été traité par le WY-14643 à 200 μ M. Ce promoteur a été muté au niveau du site PPRE α (PPRE α mut) et/ou du site PPREconsensus (PPREconsmut). L'histogramme montre le niveau d'expression du gène rapporteur dans les différentes situations (et du témoin C). Cette expérience montre que le ligand utilisé est sélectif de PPAR α .

FIGURE 4:

Expérience de retard sur gel impliquant une séquence PPRE

consensus et une séquence PPRE α correspondant à un polynucléotide utilisable selon l'invention. Les protéines PPAR α et RXR α ont été préparées selon le protocole décrit dans l'exemple 2. Selon la position de migration des complexes marqués sur le gel d'électrophorèse, il est possible de déduire si
5 l'interaction est spécifique (S : Shift ; SS : Super Shift) ou non spécifique (NS). Les interactions étudiées sont les suivantes :

- 1 : PPRE consensus (témoin)
- 2 : TNT (témoin) + PPRE consensus
- 3 : PPRE consensus (témoin) + RXR α
- 10 4 : PPREconsensus + PPAR α
- 5 : RXR α + PPAR α + PPREconsensus
- 6 : RXR α + PPAR α + PPREconsensus + anticorps spécifique de PPAR α
- 7 : PPRE α (témoin)
- 8 : TNT + PPRE α (témoin)
- 15 9 : PPRE α + RXR α
- 10 : PPRE α + PPAR α
- 11 : PPRE α + PPAR α + RXR α
- 12 : PPRE α + PPAR α + RXR α + anticorps sélectif de PPAR α

Cette expérience comparative montre que le complexe PPAR α se
20 lie préférentiellement à la séquence PPRE α utilisée selon l'invention.

FIGURE 5:

Expérience comparative de retard sur gel impliquant une séquence PPRE consensus marquée avec, en compétition, une séquence
25 PPRE consensus non marquée, une séquence PPRE α utilisable selon l'invention non marquée, des séquences PPRE α/γ et PPRE α mutées, lesdites séquences non marquées étant utilisées à des concentrations représentant 50 ou 10 fois la concentration des séquences marquées.

- 1 : PPRE marquée (témoin)
- 30 2 : PPRE marquée + TNT (témoin)
- 3 : PPRE marquée + RXR α (témoin)

- 4 : PPRE marquée + PPAR α (témoin)
- 5 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α (témoin)
- 6 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE consensus (50 fois)
- 7 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE consensus (10 fois)
- 5 8 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α/γ (50 fois)
- 9 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α/γ (10 fois)
- 10 10 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α (50 fois)
- 11 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α (10 fois)
- 12 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α/γ muté (50 fois)
- 10 13 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + compétiteur PPRE α muté (50 fois)
- 14 : PPRE marquée + RXR α + PPAR α + anticorps spécifique de PPAR α

Cette expérience montre que PPRE α forme un compétiteur plus actif que PPREconsensus.

15 **FIGURE 6:**

Expérience de retard sur gel mettant en évidence la non fixation de PPAR γ sur la séquence PPRE α . Les réactions testées consistent en les suivantes :

- 1 : TNT + PPRE consensus
- 20 2 : TNT + RXR + PPRE consensus
- 3 : TNT + RXR + PPAR α + PPRE consensus
- 4 : TNT + RXR + PPAR γ + PPREconsensus
- 5 : TNT + PPRE α/γ
- 6 : TNT + RXR + PPRE α/γ
- 25 7 : TNT + RXR + PPAR α + PPRE α/γ
- 8 : TNT + RXR + PPAR γ + PPRE α/γ
- 9 : TNT + PPRE α
- 10 : TNT + RXR + PPRE α
- 11 : TNT + RXR + PPAR α + PPRE α
- 30 12 : TNT + RXR + PPAR γ + PPRE α

Cette expérience montre la sélectivité de séquences PPRE α selon

l'invention vis-à-vis du complexe de transcription PPAR α , par rapport à PPAR γ .

EXEMPLE 1

Utilisation d'un polynucléotide utilisable selon l'invention pour l'activation d'un
5 gène rapporteur

Le plasmide pRNH25c d'expression du gène rapporteur CAT est sous la dépendance du promoteur du gène CYP1A1 humain a été utilisé. Cette construction a été généreusement donnée par le Dr Hines (Hines RN, Mathis JM and Jacob CS ; 1988, Carcinogenesis, vol 9, pages 1599-1605).

10 Le promoteur du gène CYP1A1 humain contient la séquence caractérisée comme étant spécifique de PPAR α comprenant la séquence de formule (I) (site PPRE α).

Des mutations de la séquence de formule (I) ont été réalisées à même le plasmide pRNH25c via une technique de mutagenèse dirigée
15 permettant de modifier une ou plusieurs bases (Kit Quickchange Site-Directed Mutagenesis de Stratagene[®]) et modifier les sites PPRE α et PPRE α/γ (commun aux différents membres de PPAR) présents sur le promoteur du CYP1A1.

Le protocole utilisé est celui conseillé par le concepteur du kit :

20 1 – Génération de la mutation par PCR

- 50 ng de pRNH25c
- 1,25 μ l d'une solution à 100 ng/ μ l d'amorce oligonucléotidique sens contenant la mutation
- 25 - 1,25 μ l d'une solution à 100 ng/ μ l d'amorce oligonucléotidique antisens contenant la mutation
- 5 μ l de tampon 10 X reaction buffer
- 1 μ l de Pfu Turbo DNA polymérase (2,5 unités par μ l)
- H₂O qsp 50 μ l

30

Cycle de PCR :

- 1 cycle à 95°C pendant 3 minutes puis

- 18 cycles comprenant les étapes successives
- 95°C pendant 30 secondes
- 57°C pendant 1 minute
- 72°C pendant 15 minutes

5 Les amorces utilisées pour la mutation du site PPRe α sont les suivantes:

PPRe α .mut-sens : 5'GGCCTTCCGGCCCCGTGAATTCAGGGCTGGGGTCGCAGC3'
(SEQ ID N°11)

PPRe α .mut-antisens : 5'GCTGCGACCCCAGCCCTGAATTCACGGGGCCGGAAGGCC3'
10 (SEQ ID N°12)

Les amorces utilisées pour la mutation du site PPRe α/γ sont les suivantes :

PPRe α/γ .mut-sens : 5'GGACGGGCGCCTGACCTCGATCCCCTAGAGGGATGTCG3'
15 (SEQ ID N°13)

PPRe α/γ .mut-antisens : 5'CGACATCCCTCTAGGGGATCGAGGTCAGGCGGCCCGTCC3'
(SEQ ID N°14)

Dans les deux cas, les bases en gras et soulignées correspondent aux bases mutées.

20 Dans un premier temps, le site PPRe α a été muté permettant d'obtenir la construction « PPRe α/γ + PPRe α .mut ».

Cette dernière construction a par la suite été mutée pour obtenir la construction « PPRe α/γ mut + PPRe α mut ».

25 2 – Digestion du produit de PCR

Le produit de PCR (50 μ l) est alors soumis à une digestion enzymatique médiée par 1 μ l de Dpn I (10 unités/ μ l). L'endonucléase Dpn I est spécifique de l'ADN méthylé et hemi-méthylé. Ainsi, cet enzyme digérera la matrice parentale par rapport à l'ADN néo-synthétisé par PCR (ADN non
30 méthylé).

3 – Ligation des produits de PCR

La digestion réalisée, l'ADN néo-synthétisé est soumis à une ligation au moyen de l'enzyme T4 DNA ligase selon le protocole suivant :

- 51 µl de produit de PCR digéré
- 6 µl de 10 X Ligase buffer
- 5 - 2 µl de T4 DNA ligase
- 1 µl H₂O

Ligation à 15°C durant 15 heures

4 – Transformation bactérienne

- 10 Le plasmide muté ainsi obtenu est utilisé pour transformer des bactéries Epicurial Coli XL1-Blue Supercompetent Cells fournies dans le Kit.

- 1 µl d'ADN digéré par Dpn I et ligué
- 50 µl de bactéries
- le tout est mélangé délicatement
- 15 - Incubation de 30 minutes sur glace
- Incubation de 45 secondes à 42°C
- Incubation de 2 minutes dans la glace
- Ajout de 0,5 ml de milieu de culture NZY+ (composition décrite dans le Kit)
- Incubation pendant 1 heure à 37°C sous agitation (225 à 250 rpm)
- 20 - Dépôt de 250 µl de ces bactéries transformées sur une boîte de gélose LB-Ampiciline-Agar pendant 18 heures

Pour chaque construction, un clone est sélectionné et amplifié dans 2 ml de milieu de culture NZY+ renfermant 50 µg/ml d'ampiciline.

25 5 – Vérification des clones bactériens ainsi obtenus :

La préparation de l'ADN plasmidial muté a été réalisée au moyen du Kit NucleoBond® PC 20 (Macherey Nagel), en se conformant aux recommandations du fournisseur.

- 30 Une vérification sommaire des constructions « PPRE α/γ + PPRE α mut » et « PPRE α/γ mut + PPRE α mut » a été réalisée par digestion enzymatique en utilisant l'enzyme de restriction Eco RI. Cette enzyme permet de sortir le fragment correspondant au promoteur du CYP1A1, générant ainsi

deux bandes sur gel d'agarose à 1% de 1.8 et 4.3 Kb.

6 – Amplification des constructions « PPRE α/γ + PPRE α mut » et « PPRE α/γ mut + PPRE α mut »

5 Les clones bactériens transformés avec les constructions « PPRE α/γ + PPRE α mut » et « PPRE α/γ mut + PPRE α mut » sont mises en culture à 37°C pendant 18 h sous agitation (225 à 250 rpm) dans 150 ml de NZY+ renfermant 50 µg/ml d'ampicilline.

10 Les ADN plasmidiaux sont ensuite extraits au moyen du kit NucleoBond® PC 500 (Macherey Nagel) en suivant le protocole « High Copy » du fabricant.

Après dosage spectrophotométrique, les constructions « PPRE α/γ + PPRE α mut » et « PPRE α/γ mut + PPRE α mut » ont été séquencées afin de vérifier la spécificité des mutations.

15

7 – Transfection transitoire par lipofection des cellules CaCo-2 et détermination du taux de protéine CAT (« Cat Assay »)

20 Brièvement, la lignée d'adénocarcinome colique humain CaCo-2 a étéensemencée dans des boîtes 6 puits et cultivée dans un milieu renfermant du DMEM, 15 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non-essentiels (solution de MEM 100X de la société Life Technologies), 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine; dans une atmosphère renfermant 9% de CO₂.

25 Lorsque les cellules ont atteint 40-60% de confluence, elles ont été transfectées transitoirement par lipofection au moyen de Lipofectine® (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur et avec 1 µg de construction (pRNH25C, ou « PPRE α/γ + PPRE α mut », ou « PPRE α/γ mut + PPRE α mut »).

30 48 heures après la transfection, les cellules ont été traitées pendant 48 h avec 200 µM de WY-14643 (agoniste spécifique de PPAR α) dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal (car le sérum de veau fœtal renferme des ligands de PPAR α).

Les cellules ont ensuite été rincées trois fois au PBS et le taux de protéine CAT a été déterminé au moyen du kit CAT-Elisa System® (Roche Diagnostics) en suivant les recommandations du fournisseur.

5 **EXEMPLE 2**

Mise en évidence de la fixation spécifique du complexe PPAR α /RXR α sur un polynucléotide utilisable selon l'invention par la technique du gel retard

Afin de prouver la fixation spécifique du complexe PPAR α /RXR α par rapport au complexe PPAR γ /RXR α des expériences de retard sur gel (EMSA) ont été entreprises.

1 – Synthèse in vitro des protéines PPAR α , PPAR γ et RXR α

Les protéines PPAR α , PPAR γ et RXR α ont été obtenues par un système in vitro de transcription/traduction (TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega). Brièvement, 40 μ l de TNT T7 quick master mix, 1 μ l de méthionine 1 mM, 1 μ g de plasmide (plasmide exprimant l'ADNc de PPAR α , ou de PPAR γ , ou de RXR α) et de l'eau qsp 50 μ l ont été incubés pendant 60 minutes à 30°C.

20 2 - Marquage des sondes

Cinq sondes ont été marquées au P³² (sites PPRE soulignés, bases mutées en gras) :

Sonde PPRE consensus :

PPRE Consensus F : 5'CCGCCAAGCTTGCTCCGCCAGGTCACAGGTCACTAG3'

25 (SEQ ID N°15)

PPRE Consensus-R : 5'CTAGTGACCTGTGACCTGGCGGAGCAAGCTTGGCGG3'

(SEQ ID N°16)

Sonde PPRE α :

30 PPRE α -F : 5'GGCCTTCCGGCCCCGTGACCTCAGGGCTGGGGTCGCAGC3'
(SEQ ID N°17)

PPRE α -R : 5' GCTGCGACCCCAGCCCTGAGGTCACGGGGCCGGAAGGCC3'

(SEQ ID N°18)

Sonde PPRE α muté :

PPRE α muté-F : 5'GGCCTTCCGGCCCCGTGAATTCAGGGCTGGGGTCGCAGC3'

(SEQ ID N°19)

5 PPRE α muté-R : 5'GCTCGACCCCAGCCCTGAATTCACGGGGCCGGAAGGCC3'

(SEQ ID N°20)

Sonde PPRE α/γ :

PPRE α/γ -F : 5'GGACGGGCGCCTGACCTCTGCCCCCTAGAGGGATGTCG3'

(SEQ ID N°21)

10 PPRE α/γ -R : 5'CGACATCCCTCTAGGGGGCAGAGGTCAGGCGGCCCCGTCC3'

(SEQ ID N°22)

Sonde PPRE α/γ muté :

PPRE α/γ muté-F : 5'GGACGGGCGCCTGACCTCGATCCCCTAGAGGGATGTCG3'

(SEQ ID N°23)

15 PPRE α/γ muté-R : 5'CGACATCCCTCTAGGGGATCGAGGTCAGGCGGCCCCGTCC3'

(SEQ ID N°24)

Dans un premier temps, les oligonucléotides F et R ont été hybridés de la façon suivante :

- régénérer les oligonucléotides dans de l'eau à la concentration de 1 μ g/ml;
- 20 - dans un tube ajouter 5 μ l de l'oligonucléotide F, 5 μ l l'oligonucléotide R, 5 μ l de tampon d'hybridation 10X (Tris 0.5M à pH 8.0, MgCl₂ 100 mM) et 35 μ l d'eau;
- chauffer 5 minutes à 100 °C puis laisser redescendre à la température ambiante.

25 Dans un deuxième temps, les sondes d'ADN double brin sont marquées au P³² au moyen de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen) de la façon suivante :

- dans un tube ajouter 1 μ l de sonde d'ADN double brin, 2 μ l de forward buffer, 1.5 μ l de P³² ATP (3000 Ci/mM, 10 mCi/ml), 4.5 μ l d'eau et 1 μ l de T4
- 30 polynucléotide kinase
- incubé à 37°C pendant 30 minutes
- rajouter au mélange 40 μ l d'eau et 2 μ l d'EDTA 0.5 M

- purifier les sondes sur colonne ProbeQuant G-50 micro column (Amersham Biosciences) selon les recommandations du fournisseur
- diluer la solution de sonde jusqu'à obtenir 50000 cpm/ μ l

5 3 – Gel retard

Dans un premier temps, 2 μ l de protéines (PPAR α , ou PPAR γ , ou RXR α , ou PPAR α +RXR α , ou PPAR γ +RXR α) ont été incubées 20 min à température ambiante avec 1 μ l de sonde radiomarquée (50000 cpm/ μ l) dans un tampon renfermant 10 mM Tris Base (pH 8.0), 100 mM KCl, 10% glycérol, 1
10 mM dithiothréitol, 1 μ g poly (dIdC) et 0.5 μ g de sperme de saumon, en présence ou en absence de 1 μ l de compétiteur non marqué (utilisé à une concentration finale 10-fois ou 50-fois supérieure à celle de la sonde marquée, les solutions sont préparées dans le tampon d'hybridation décrit précédemment et ramenées à la concentration 1X avec de l'eau). Lors des expériences de
15 « supershift » un anticorps anti-PPAR α humain (anti human PPAR α antibody N-19, Santa Cruz Biotechnology) a été rajouté au mélange (0.25 μ l d'une solution d'anticorps à 200 μ g/ml).

Dans un deuxième temps, le mélange a été soumis à une électrophorèse en gel vertical de 4% de polyacrylamide (gels de #20 cm de
20 longueur) en utilisant comme tampon de migration un tampon Tris Base 45 mM renfermant 45 mM d'acide borique et 1 mM d'EDTA. Après séparation, le gel a été séché et une autoradiographie a été réalisée en exposant le gel séché sur un film Kodak X-AR.

Le cliché autoradiographique permet de visualiser les différentes
25 positions occupées par les complexes PPAR sur le gel d'électrophorèse comme illustré dans les figures 4 à 6. Selon la position de migration, il est possible de déduire si l'interaction entre la séquence PPRE et PPAR α est, dans les conditions données, non spécifique (NS) ou spécifique (Shift ou Super Shift lorsqu'un anticorps sélectif est utilisé).

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un polynucléotide comprenant

i) une séquence de formule (I)

5

- TGACCTNOGGGCT-

dans laquelle A, C, G et T désignent respectivement les bases adénine, cytosine, guanine et thymine, N représente une base nucléotidique naturelle ou synthétique quelconque modifiée ou non et O représente

10

une base qui est A, T ou U; ou
ii) une séquence complémentaire de (I) telle que définie sous i),
ladite séquence (I) ou complémentaire de (I) permettant l'interaction
sélective dudit polynucléotide avec un ou plusieurs éléments constitutifs
du complexe de transcription PPAR α ,

15

pour évaluer l'activité de transcription de PPAR.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence de formule (I) correspond à SEQ ID N°1.

3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence de formule (I) correspond à une séquence choisie parmi SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ ID N°5, SEQ ID N°6, SEQ ID N°7, SEQ ID N°8, SEQ ID N°9, SEQ ID N°10, SEQ ID N°17 et SEQ ID N°18.

20

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit polynucleotide comprend en outre, une séquence de type PPRE.

25

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polynucléotide comprend en outre la séquence d'un gène dont la transcription est placée sous le contrôle de PPAR.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit polynucléotide comprend en outre la séquence d'un gène rapporteur.

30

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle

- l'élément fonctionnel interagissant avec la séquence (I) ou complémentaire de (I) est le complexe de transcription PPAR α , en présence d'un ligand spécifique de celui-ci.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle permet de différencier une activité de transcription de type PPAR γ et PPAR α .
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle l'activité de transcription est dépendante de PPAR α .
10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle l'évaluation de l'activité de transcription de PPAR permet de caractériser de nouvelles séquences de type PPRE.
11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle permet de diagnostiquer une maladie liée à une dérégulation de l'expression de gènes sous contrôle de PPAR.
12. Utilisation selon la revendication 11, dans laquelle ladite maladie est une maladie liée à une modification de l'activité de PPAR, telle que l'hypertryglycémie et le diabète de type II.
13. Un vecteur comprenant au moins une séquence nucléotidique de formule (I) ou complémentaire de (I) telle que définie dans la revendication 1, et un gène rapporteur.
14. Une cellule hôte contenant un vecteur tel que défini dans la revendication 13 ou un polynucléotide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.
15. Procédé de dosage de PPAR α ou d'un élément constitutif du complexe PPAR α , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 1) fixation sur une phase solide d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1;
 - 2) mise en contact d'un échantillon dans lequel PPAR α ou un élément constitutif du complexe PPAR α est à quantifier;
 - 3) détection de PPAR α ou de l'élément constitutif du complexe PPAR α retenu par lesdits polynucléotides.
16. Procédé de mise en évidence de composés susceptibles d'interférer avec

l'activité de transcription de PPAR, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

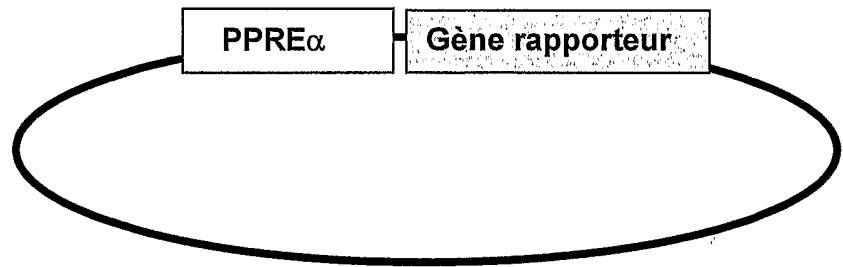
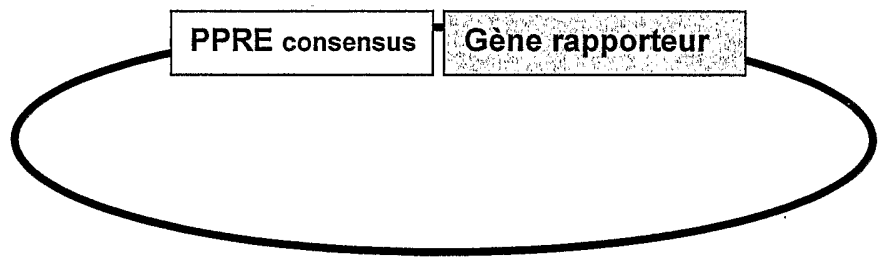
- 1) marquage d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1;
 - 2) mise en contact de PPAR α et du polynucléotide marqué, en présence d'un ou plusieurs composés;
 - 3) détection des complexes moléculaires marqués.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il permet de mettre en évidence des composés capables d'interagir sélectivement avec PPAR α .
18. Procédé de détermination de la spécificité d'une séquence nucléotidique de type PPRE, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 1) marquage du complexe formé par les protéines PPAR-RXR;
 - 2) mise en contact du complexe PPAR-RXR marqué avec un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1, 2 ou 3 fixé sur un support;
 - 3) ajout dans la phase libre d'une concentration de la séquence nucléotidique de type PPRE dont on cherche à déterminer la spécificité;
 - 4) détection des complexes moléculaires formés autour du complexe PPAR-RXR marqué.
19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, dans lequel on utilise un polynucléotide témoin n'interagissant pas avec PPAR, ledit polynucléotide témoin correspondant à un polynucléotide tel que défini dans les revendication 1, 2 ou 3 dans lequel la séquence de formule (I) ou complémentaire de (I) a été mutée ou a subi une délétion.
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le polynucléotide témoin comprend au moins une séquence choisie parmi SEQ ID N°11, SEQ ID N°12, SEQ ID N°19 et SEQ ID N°20.
21. Procédé de mise en évidence de composés capables d'augmenter ou de diminuer l'activité de transcription de PPAR α , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 1) transformation d'une cellule hôte à l'aide d'un polynucléotide tel que

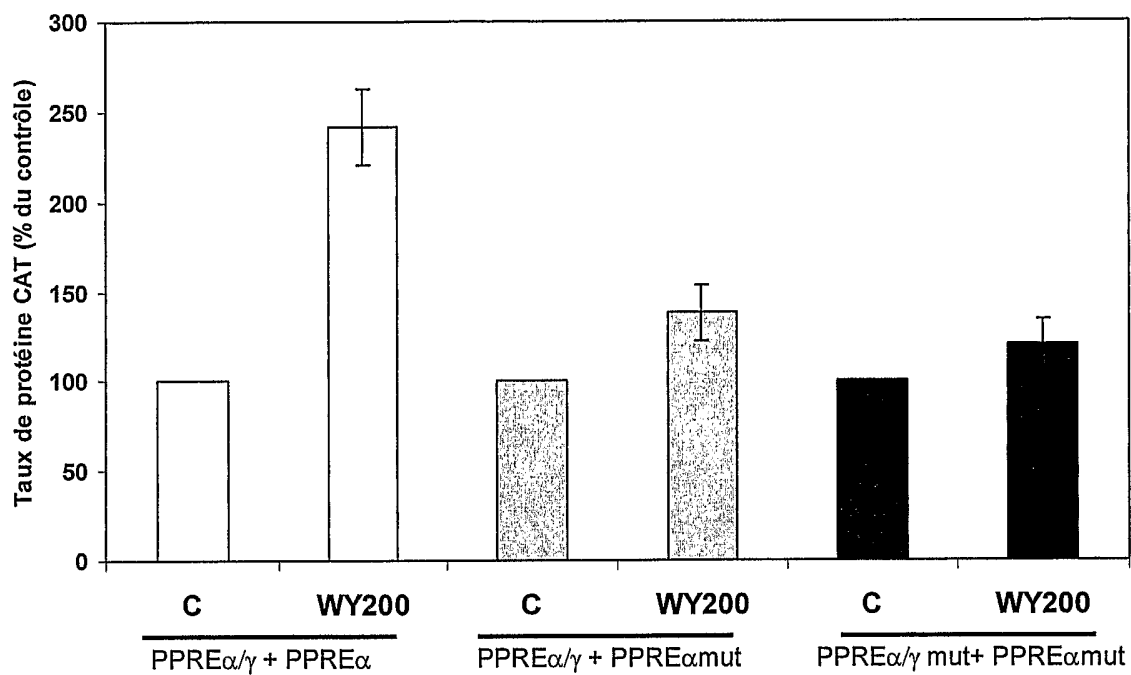
- défini dans la revendication 6, comprenant une séquence PPRE α et un gène rapporteur;
- 2) mise en culture de la cellule hôte obtenue à l'étape 1);
- 3) mise en contact de la cellule hôte cultivée à l'étape 2) avec le composé ou le mélange de composés à tester;
- 5 4) détection de l'expression du gène rapporteur.
22. Procédé de mise en évidence de composés, suivant la revendication 21, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 1) transformation d'une cellule hôte à l'aide d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 6, comprenant une séquence PPRE α et un gène rapporteur;
- 10 2) transformation d'une cellule hôte témoin à l'aide d'un polynucléotide témoin tel que défini dans les revendications 19 et 20;
- 3) mise en culture des cellules hôtes obtenues aux étapes 1) et 2);
- 15 4) mise en contact des cellules hôtes cultivées avec le composé ou le mélange de composés à tester;
- 5) détection de l'expression du gène rapporteur;
- 6) comparaison des résultats obtenus.
23. Procédé de préparation d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en
- 20 1) la synthèse chimique directe et programmée; ou
- 2) la réplication d'une séquence PPRE α d'intérêt dans une cellule hôte; ou
- 3) l'amplification d'une séquence PPRE α d'intérêt par PCR.
- 25 24. Kit de caractérisation des interactions entre séquences polynucléotidiques de type PPRE et complexes de transcription de type PPAR, caractérisé en ce qu'il comprend au moins:
- une préparation d'au moins un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1, 2 ou 3;
- 30 - une préparation des protéines purifiées PPAR-RXR, dont un des membres au moins est marqué;
- un moyen de détection des molécules marquées.

25. Kit selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre un polynucléotide témoin tel que défini dans la revendication 19 ou 20, et/ou une séquence de type PPRE γ et/ou une séquence de type PPRE α/γ .
26. Kit selon l'une des revendications 24 et 25, caractérisé en ce qu'il
5 comprend, en outre, un substrat spécifique marqué ou non marqué permettant d'incuber PPAR en présence d'un polynucléotide qui lui est spécifique.
27. Un médicament caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide tel que défini dans les revendications 1, 2 ou 3.
- 10 28. Utilisation d'un polynucléotide tel que défini dans la revendication 1 pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une modification de l'activité de PPAR, telle que l'hypertryglycémie, le diabète de type II ou les lipodystrophies.

CYP1A1 PPRe α	
Human CYP1A1 (D10855)	-541 t c c g g c c c c g T G A C C T c A G G G C T g g g t c g c a g -509
Rat CYP1A1 (M14633)	-591 t c c t g c c c t g T G A C C T c T G G G C T g g g t c g c t g -559
Mouse Cyp1a1 (AF210905)	-533 t c c t g t c c t g T G A C C T c T G G G C T g g g t c g t t g -501

FIGURE 1

Construction N°1:**Construction N°2 :****FIGURE 2**



Promoteur du CYP1A1

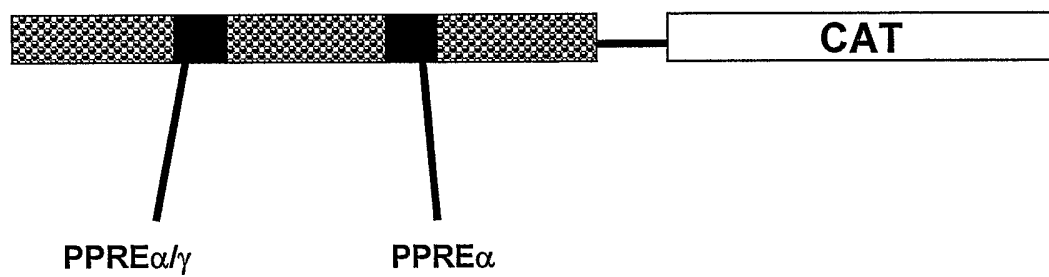


FIGURE 3

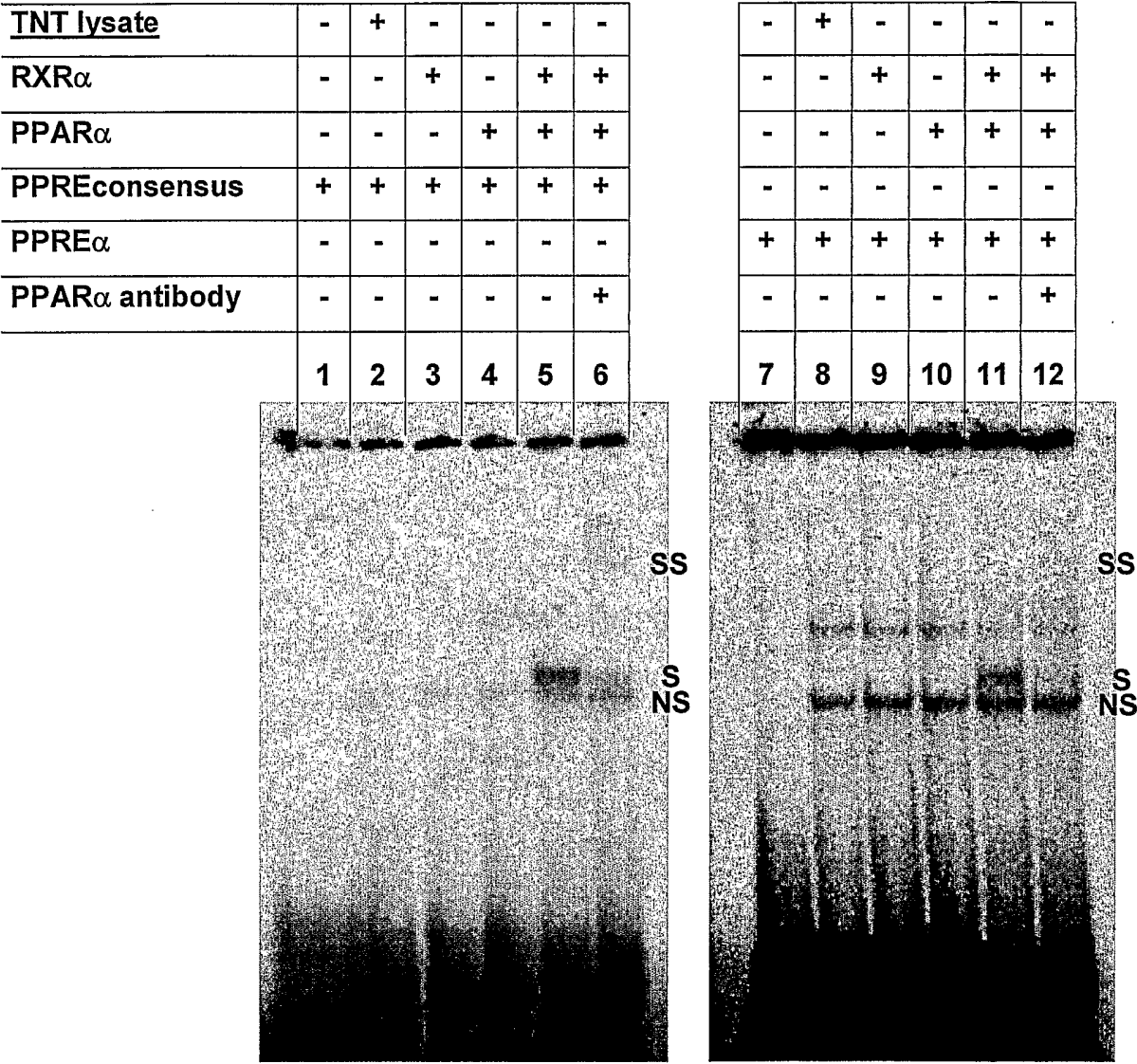


FIGURE 4

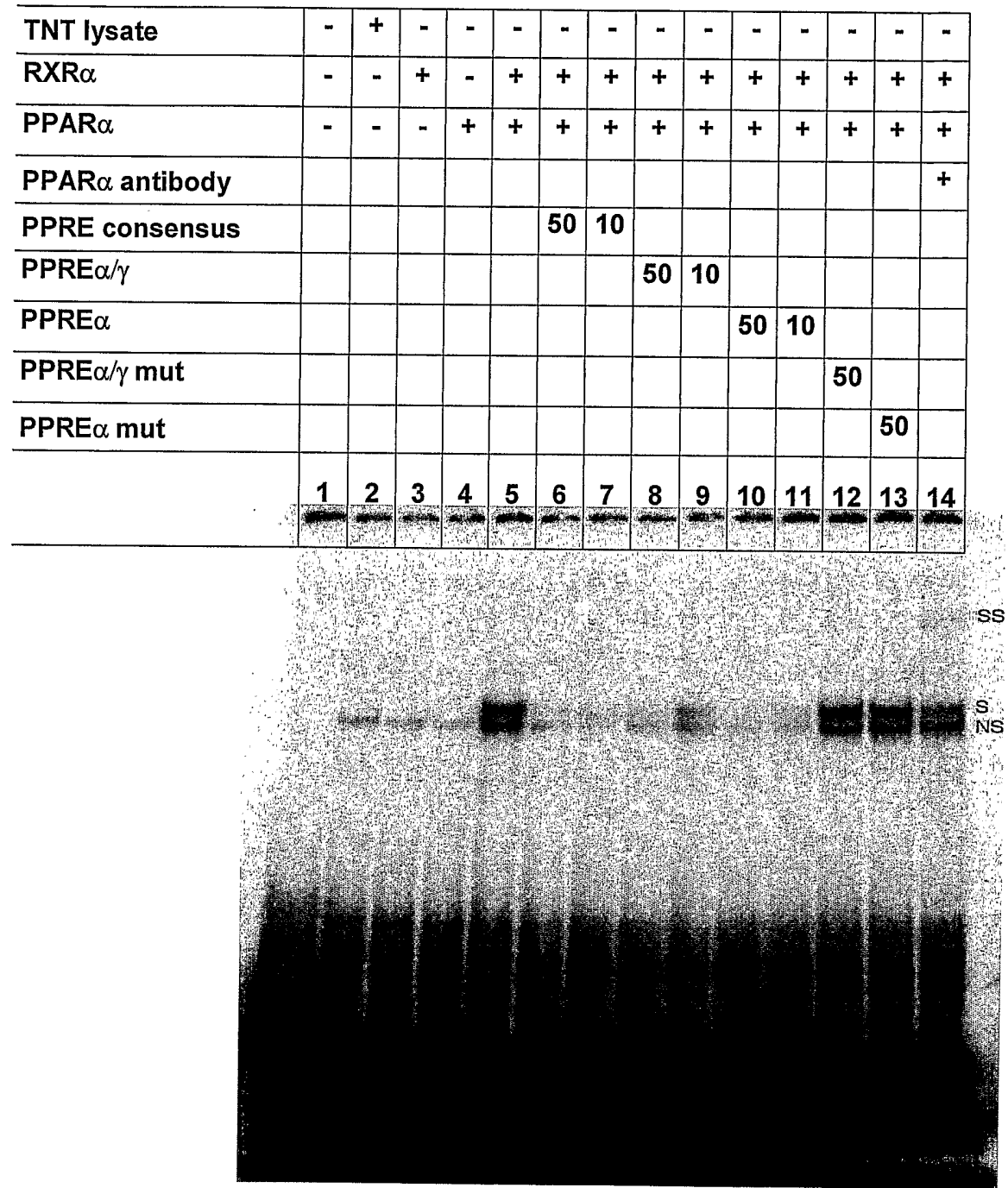


FIGURE 5

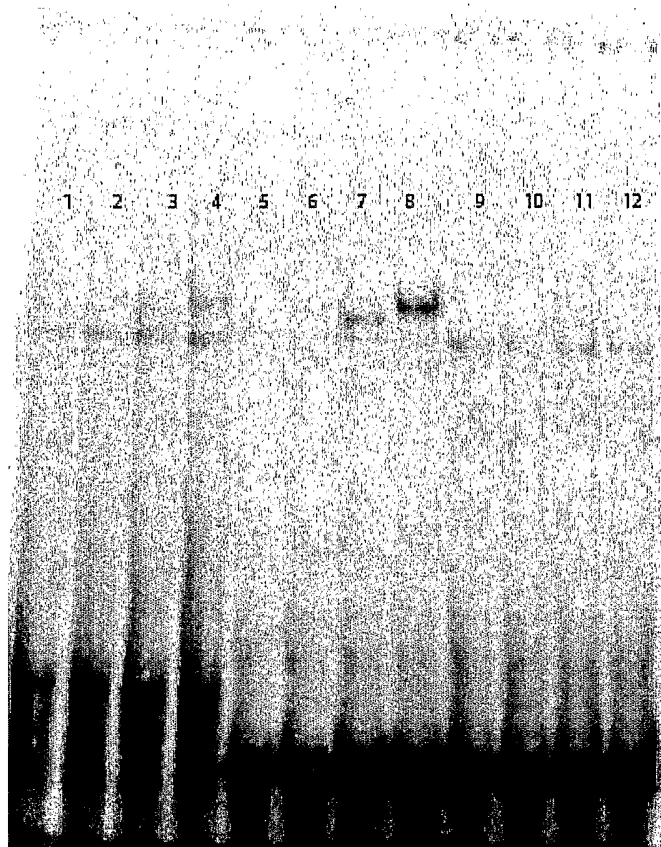


FIGURE 6

BIM128 FR.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> Utilisation de séquences nucléotidiques interagissant préférentiellement avec le complexe de transcription PPAR alpha

<130> BIM 000128 WO

<140> PCT/FR../.....
<141> 2005-12-12

<150> FR 04 13423
<151> 2004-12-16

<160> 24

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 13
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
tgacctcagg gct 13

<210> 2
<211> 13
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
agccctgagg tca 13

<210> 3
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 3
ggccttccgg ccccgtagacc tcagggctgg ggtagcgag 38

<210> 4
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 4
ccggaaggcc ggggcactgg agtcccgacc ccagcgtc 38

<210> 5
<211> 38
<212> DNA

BIM128 FR.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 5

ggccttccgg ccccgtagacc tctgggctgg ggtagcag 38

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 6

ccggaaggcc ggggcactgg agacccgacc ccagcgtc 38

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 7

tccggccccg tgacctcagg gctgggggtcg cag 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 8

aggccggggc actggagtcc cgacccagc gtc 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 9

tccggccccg tgacctctgg gctgggggtcg cag 33

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

BIM128 FR.ST25

<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 10
aggccggggc actggagacc cgaccccagc gtc 33

<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha, lequel site est muté.

<400> 11
ggccttccgg ccccgatgaat tcagggctgg ggtcgcagc 39

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha, lequel site est muté.

<400> 12
gctgcgaccc cagccctgaa ttcacggggc cggaaggcc 39

<210> 13
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier la fois PPAR alpha et PPAR gamma, lequel site est muté.

<400> 13
ggacgggccg cctgacctcg atcccctaga gggatgtcg 39

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier à la fois PPAR alpha et PPAR gamma, lequel site est muté.

<400> 14
cgacatccct ctaggggatc gaggtcaggc ggccccgtcc 39

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier spécifiquement PPAR.

BIM128 FR.ST25

<400> 15
ccgccaagct tgctccgcca ggtcacaggt cactag 36

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier spécifiquement PPAR.

<400> 16
ctagtgcacct gtgacctggc ggagcaagct tggcgg 36

<210> 17
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 17
ggccttccgg ccccgtagacc tcagggctgg ggtcgcagc 39

<210> 18
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha

<400> 18
gctgcgaccc cagccctgag gtcacggggc cggaaggcc 39

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha, lequel site est muté.

<400> 19
ggccttccgg ccccgtagaat tcagggctgg ggtcgcagc 39

<210> 20
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier sélectivement PPAR alpha, lequel site est muté.

<400> 20
gctgcgaccc cagccctgaa ttcacggggc cggaaggcc 39

BIM128 FR.ST25

<210> 21
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier
à la fois PPAR alpha et PPAR gamma.

<400> 21
ggacgggccg cctgacctct gccccctaga gggatgtcg 39

<210> 22
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier
à la fois PPAR alpha et PPAR gamma..

<400> 22
cgacatccct ctagggggca gaggtcaggc ggcccgtcc 39

<210> 23
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier
à la fois PPAR alpha et PPAR gamma, lequel site est muté.

<400> 23
ggacgggccg cctgacctcg atcccctaga gggatgtcg 39

<210> 24
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> séquence artificielle d'ADN comprenant un site permettant de lier
à la fois PPAR alpha et PPAR gamma, lequel site est muté.

<400> 24
cgacatccct ctaggggatc gaggtcaggc ggcccgtcc 39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61P3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEREE E ET AL: "Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites" GASTROENTEROLOGY, vol. 127, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 1436-1445, XP002336384 ISSN: 0016-5085 the whole document ----- -/--	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 2006

Date of mailing of the international search report

28/03/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/003099

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FLAVELL D M ET AL: "Variation in the PPARalpha gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in Type II diabetic subjects" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, vol. 43, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 673-680, XP002187936 ISSN: 0012-186X page 678, right-hand column, paragraph 1 - page 679, left-hand column, paragraph 2 -----	1-28
Y	KERSTEN SANDER ET AL: "Roles of PPARs in health and disease" NATURE (LONDON), vol. 405, no. 6785, 25 May 2000 (2000-05-25), pages 421-424, XP002336385 ISSN: 0028-0836 page 422, right-hand column, paragraph 4 - page 423, right-hand column, paragraph 1 page 424, left-hand column, last paragraph -----	1-28
A	HINES R N ET AL: "Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene." CARCINOGENESIS. SEP 1988, vol. 9, no. 9, September 1988 (1988-09), pages 1599-1605, XP009050633 ISSN: 0143-3334 -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2005/003099

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61P3/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12Q C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SEREE E ET AL: "Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites" GASTROENTEROLOGY, vol. 127, no. 5, novembre 2004 (2004-11), pages 1436-1445, XP002336384 ISSN: 0016-5085 le document en entier ----- -/-	1-28
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 10 mars 2006		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 28/03/2006
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Seroz, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/FR2005/003099

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	FLAVELL D M ET AL: "Variation in the PPARalpha gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in Type II diabetic subjects" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, vol. 43, no. 5, mai 2000 (2000-05), pages 673-680, XP002187936 ISSN: 0012-186X page 678, colonne de droite, alinéa 1 - page 679, colonne de gauche, alinéa 2	1-28
Y	KERSTEN SANDER ET AL: "Roles of PPARs in health and disease" NATURE (LONDON), vol. 405, no. 6785, 25 mai 2000 (2000-05-25), pages 421-424, XP002336385 ISSN: 0028-0836 page 422, colonne de droite, alinéa 4 - page 423, colonne de droite, alinéa 1 page 424, colonne de gauche, dernier alinéa	1-28
A	HINES R N ET AL: "Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene." CARCINOGENESIS. SEP 1988, vol. 9, no. 9, septembre 1988 (1988-09), pages 1599-1605, XP009050633 ISSN: 0143-3334	