



**EXTRAIT
DU
REGISTRE DES DELIBERATIONS**
du Conseil de Communauté de l'Agglomération Dijonnaise

Séance du 12 mai 2005

Membres présents :

Président : M. REBSAMEN

Secrétaires : Melle MASLOUHI - M. BEKHTAOUI

M. ALLAERT - M. AUDARD - Mme AVENA - M. BACHELARD - M. BARBEY -
M. BELLEVILLE - M. BERNARD J.J. - Melle BERNARD M. - M. BERTELOOT -
Mme BIOT - Mme BLIGNY - M. BOUHELIER - M. BOURNY - M. BRESSAND -
M. BRUYERE - M. CARBONNEL - M. CHAPUIS - M. CHEVIGNY -
Mme COLOMBET - M. DANIERE - Mme DARCIAUX - M. DELATTE -
Mme DELEBARRE - M. DESVIGNES - M. DINCHER - M. DODET -
M. DOUHAI - M. DUBOIS - M. DUPIRE - Mme DURNERIN - M. ESMONIN -
Mme FLAMENT - M. FOUCHERES - M. FOUILLOT - Mme GARRET-RICHARD -
M. GERVAIS - M. GILLOT J.P. - M. GILLOT G. - M. GONDELLIER -
Mme HERVIEU - M. HESSE - M. IZIMER - M. JOLY - M. JULIEN -
M. LABORIER - M. LAURENT - Mme LEMOUZY - M. MAGLICA -
Mme MANSAT - M. MARCHAND - M. MARTIN - M. MASSON - Mme MASSU -
M. MENUT - M. MOREAU - M. NOWOTNY - M. PERRIN - M. PETITJEAN -
M. PILLIEN - M. PINON - Mme POPARD - M. PRIBETICH - M. RETY -
Mme ROY - M. SAUNIE - M. SOUMIER - M. VOUILLOT

Membres absents :

Mme BESSIS (pouvoir à Mme BIOT) - M. BRENOT (pouvoir à M. PERRIN) -
M. BRIOT - M. ETIEVANT (pouvoir à Mme DARCIAUX) - M. MILLOT (pouvoir à
M. GILLOT G.) - M. NUDANT (pouvoir à M. BRIOT) - M. OBRIOT (pouvoir à
M. PILLIEN) - M. PARIS - M. ROIZOT (pouvoir à M. BARBEY) -
Mme TENENBAUM

**OBJET : DEVELOPPEMENT ECONOMIQUE ET TIC - Programme de recherche - Partenariat
Conseil Régional de Bourgogne / Conseil Général de Côte-d'Or / Grand Dijon, Bourgogne Technologies
et Laboratoires FOURNIER SA.**

Dès mai 2004, la Région et le Grand Dijon sont interpellés sur l'absence de passerelles entre la recherche publique et privée et notamment avec les grands laboratoires pharmaceutiques de la région comme Laboratoires FOURNIER SA.

Avec le groupe opérationnel habituel, le Grand Dijon fait établir des contacts entre Laboratoires FOURNIER et l'IFR 100 qui débouchent sur un programme de recherche. En juillet 2004, Laboratoires FOURNIER se voit contraint d'adapter son organisation du fait d'un environnement de plus en plus contraignant pour l'industrie pharmaceutique et de sa taille critique.

Un Plan de sauvegarde de l'emploi (PSE) mis en place pour accompagner cette décision comporte des mesures visant à favoriser au maximum le reclassement interne ou à défaut externe des salariés concernés, mais aussi des mesures visant à la réactivation du bassin d'emploi affecté par la réorganisation.

Le programme de recherche évoqué est d'ailleurs en parfaite corrélation avec les projets du canceropôle gérés par les mêmes chercheurs et avec le soutien des collectivités locales.

Dans le cadre de cette réactivation du bassin d'emploi, l'idée de renforcer les passerelles entre recherche privée et publique est confortée. Une convention est en cours d'élaboration entre l'Etat et Laboratoires FOURNIER SA, ayant pour but de financer à hauteur de 900 000 € un important programme de recherche dans le domaine des lipides du cholestérol et du cancer, et de confier ce programme de recherche à Bourgogne Technologie et à l'Institut IFR 100. Laboratoires FOURNIER finance l'intégralité de cette première étude.

Ce montage original et inédit au-delà de l'intérêt majeur de la mise en place d'une passerelle de développement de recherche dans des secteurs essentiels tant pour le secteur privé que public, accompagne et permet l'émergence d'un projet industriel visant au développement d'activités économiques et d'emplois sur notre territoire.

Dans cet esprit, une seconde convention, concomitante avec la première, soutenue par le Grand Dijon, la Région et le Département accompagne cet ambitieux projet, en confortant le programme général de recherche mis au point par les chercheurs, et apporte son soutien à cette opération en finançant un programme de recherche complémentaire sur le thème : Recherche d'effets cytotoxiques, cytostatiques ou chimiosensibilisants par des ligands de récepteurs nucléaires notamment dans l'application anti-cancéreuse.

En résumé, les objectifs de cet accompagnement sont les suivants :

- favoriser les passerelles secteur public et privé et, par là, les transferts de technologie pour in fine développer l'activité et l'emploi;
- valoriser les savoirs faire de haut niveau pour renforcer l'attractivité de l'agglomération dijonnaise dans le domaine du biomédical;
- renforcer le pôle de compétitivité « Goût-Nutrition-Santé » au travers de ces deux programmes de recherche : Lipides cholestérol et lutte contre le cancer.

La Région, le Département et le Grand Dijon s'engagent à apporter chacun une contribution de 230 000 € sur 3 ans, représentant 93% du coût total TTC du programme. Un premier versement de 69 000 € interviendra en 2005, dès signature de la convention précisant les modalités de réalisation et de financement du programme de recherche.

Vu l'avis de la Commission,

LE CONSEIL
Après en avoir délibéré

DECIDE

- **d'arrêter** le montant de la participation de la Communauté de l'agglomération dijonnaise à Bourgogne Technologies pour le programme de recherche commun à Laboratoires Fournier et à l'IFR 100 de l'Université de Bourgogne, à 230 000 € sur trois ans ;
- **de dire** qu'un premier versement de 69 000 € interviendra dès l'année 2005 ;
- **d'approuver** le projet de convention à intervenir entre les différents partenaires, ci-annexé ;
- **d'autoriser** le Président à signer cette convention.

Pour extrait conforme,
Président



Publié le **17 MAI 2005**
Déposé en Préfecture le

PRÉFECTURE DE LA CÔTE-D'OR
Déposé le :

18 MAI 2005



CONTRAT DE RECHERCHE

REGION-GRAND DIJON-CONSEIL GENERAL 21- BOURGOGNE
TECHNOLOGIES- LABORATOIRES FOURNIER S.A.

PRÉFECTURE DE LA CÔTE-D'OR

Déposé le :

18 MAI 2005



VU pour être annexé à délibération

du Conseil du : 12 MAI 2005

DIJON, le :

LE PRÉSIDENT



Entre :

Le Conseil régional de Bourgogne, désigné ci-après par la Région, 1 Trémouille, 21000 DIJON, représenté par le Président du Conseil régional de Bourgogne, **Monsieur François PATRIAT**,

Le Conseil général de la Côte d'Or, désigné ci-après par le Département, 53 bis rue de la Préfecture, 21000 DIJON, représenté par le Président du Conseil général de la Côte d'Or, **Monsieur Louis de BROISSIA**,

La Communauté de l'agglomération dijonnaise, désignée ci-après par le Grand Dijon, 40 Av du Drapeau, 21075 DIJON, représentée par le Président de la Communauté de l'agglomération dijonnaise **Monsieur François REBSAMEN**,

Laboratoires FOURNIER S.A., désigné ci-après par l'Entreprise, 50 rue de Dijon, 21121 DAIX, représenté par son Directeur Général **Monsieur Pierre MOUSTIAL**,

L'association Bourgogne Technologies, désignée ci-après par BT, 8 av. Jean Bertin, BP 672, 21017 DIJON CEDEX, représentée par son Président **Monsieur Jean-Paul LEQUIN**,

Vu la demande de Bourgogne Technologies en date du

Vu la convention entre l'Etat et LABORATOIRES FOURNIER SA relative à la réactivation du bassin d'emploi (article 118 de la loi de modernisation sociale du 17 janvier 2002)

Vu la délibération de la
date du

du Conseil régional de Bourgogne en

Vu la délibération de la
en date du

du Conseil général de la Côte d'Or

Vu la délibération de la
l'agglomération dijonnaise en date du

de la communauté de

Il a été convenu ce qui suit :

En préambule :

Considérant l'enjeu national que représente le développement de la recherche dans le cadre à la fois d'une économie compétitive, mais aussi comme déterminant pour l'attractivité d'un territoire,

Considérant les savoir-faire de haut niveau existant sur le territoire bourguignon entre d'une part les départements de recherche de Laboratoires FOURNIER SA et d'autre part les laboratoires publics de recherche,

Considérant le développement de l'agglomération dijonnaise dans le domaine biomédical,

Considérant le poids particulier de Laboratoires FOURNIER SA sur l'économie locale,

Considérant les difficultés de Laboratoires FOURNIER SA qui contraignent l'entreprise à adapter ses organisations, ce qui a notamment pour conséquence la suppression de 174 emplois dont 47 en région Bourgogne,

Considérant l'obligation pour Laboratoires FOURNIER SA de contribuer à la réactivation du bassin d'emploi au titre de l'article 118 de la loi de modernisation sociale du 17 janvier 2002,

Considérant la volonté de Laboratoires FOURNIER SA de mener un programme de recherche en collaboration avec l'Université de Bourgogne et Bourgogne Technologies,

Le Conseil régional de Bourgogne, le Conseil général de la Côte d'Or et la Communauté de l'agglomération dijonnaise ont souhaité apporter leur appui, par la présente convention, à celle conclue entre Laboratoires FOURNIER SA, l'Université de Bourgogne, Bourgogne Technologie et l'Etat.

Article 1 : Domaine du contrat :

La présente convention a pour objet de préciser les conditions dans lesquelles sera réalisé et financé le programme de recherche intitulé :

Recherche d'effets cytotoxiques, cytostatiques ou chimiosensibilisants par des ligands de récepteurs nucléaires.

Dont le détail est décrit en annexe.

Article 2 : Modalités d'exécution :

L'objectif général des études et travaux ainsi que le programme de recherche ont été établis respectivement par les responsables scientifiques de l'Entreprise, de l'Institut fédératif de recherche 100 (Université de Bourgogne) et de BT.

2.1. Le programme et la répartition des travaux sont ceux figurant en annexe.

Pour la part de recherche qui lui incombe, BT s'engage à réaliser elle-même les travaux de recherche ou d'adaptation prévus par le programme dans ses locaux et par ses moyens propres, ou, en cas de besoin, à ne les donner en sous-traitance qu'à des organismes publics de recherche, des centres techniques ou à des organismes personnalisés à but non lucratif disposant de moyens propres et exceptionnellement à des sociétés privées après accord de la Région, du Département et du Grand Dijon. Dans ce cas, elle communique aux collectivités ci-dessus la liste des sous-traitants.

2.2. Les moyens mis en œuvre pour la réalisation de ce programme de recherche sont décrits en annexe.

Article 3 : Financement des travaux :

Une annexe financière jointe précise le détail et les modalités de la participation financière de chacun des co-contractants.

Chacune des parties au contrat s'engage à réaliser le programme de recherche cité à l'article 1 de la présente convention et à réunir les moyens techniques et financiers nécessaires à son exécution.

En cas de désistement non motivé de l'une ou l'autre partie au contrat en cours d'exécution du programme de recherche, la Région, le Département et le Grand Dijon se réservent le droit de faire procéder au reversement de la subvention accordée.

Dans le cadre de ces travaux, et conformément à l'annexe financière jointe, la Région, le Département et le Grand Dijon s'engagent à apporter chacun une contribution de **230 000 €**, représentant globalement **93% du coût total TTC** du programme mentionné en annexe.

Article 4 : Modalités de versement des participations financières :

4.1. Modalités de versement de la participation de la Région :

Afin de faciliter le démarrage du programme, une avance forfaitaire égale à 30% de la subvention de la Région, soit 69 000 € sera accordée dès la signature de la convention.

D'autres acomptes pourront être versés à la demande de BT sur production des justifications faisant apparaître le montant des dépenses engagées.

Le versement du solde de la subvention sera effectué sur production des justifications faisant apparaître le montant total des dépenses engagées qui devront être au minimum égales au coût total du programme et d'un compte rendu final des travaux effectués.

Tous les versements seront effectués à BT.

Les dispositions du règlement d'intervention et de versement des subventions régionales s'appliqueront sur l'ensemble des dispositions non traitées dans la présente convention.

4.2. Modalités de versement de la participation du Département :

Afin de faciliter le démarrage du programme, une avance forfaitaire égale à 30% de la subvention du Département, soit 69 000 € sera accordée dès la signature de la convention.

D'autres acomptes pourront être versés à la demande de BT sur production des justifications faisant apparaître le montant des dépenses engagées.

Le versement du solde de la subvention sera effectué sur production des justifications faisant apparaître le montant total des dépenses engagées qui devront être au minimum égales au coût total du programme et d'un compte rendu final des travaux effectués.

Tous les versements seront effectués à BT.

Les dispositions du règlement d'intervention et de versement des subventions départementales s'appliqueront sur l'ensemble des dispositions non traitées dans la présente convention.

4.3. Modalités de versement de la participation du Grand Dijon :

Afin de faciliter le démarrage du programme, une avance forfaitaire égale à 30% de la subvention du Grand Dijon, soit 69 000 € sera accordée dès la signature de la convention.

D'autres acomptes pourront être versés à la demande de BT sur production des justifications faisant apparaître le montant des dépenses engagées.

Le versement du solde de la subvention sera effectué sur production des justifications faisant apparaître le montant total des dépenses engagées qui devront être au minimum égales au coût total du programme et d'un compte rendu final des travaux effectués.

Tous les versements seront effectués à BT.

Les dispositions du règlement d'intervention et de versement des subventions du Grand Dijon s'appliqueront sur l'ensemble des dispositions non traitées dans la présente convention.

Article 5 : Confidentialité, publications, propriété intellectuelle :

Les parties s'engagent à conserver confidentiels les travaux effectués, les résultats et les informations obtenus dans le cadre du contrat. Toutefois, les travaux et résultats pourront être communiqués aux directions scientifiques dont relèvent les chercheurs impliqués dans le programme pour évaluation de leurs activités sous réserve d'une obligation de confidentialité.

Les publications et communications scientifiques, les prises de brevets et l'exploitation commerciale devront faire l'objet d'un contrat particulier entre BT, l'Université de Bourgogne et l'Entreprise. Une copie de ce contrat sera adressée à la Région, au Département et au Grand Dijon.

La Région, le Département et le Grand Dijon seront informés par écrit de toute demande, le cas échéant, de dépôt de brevet ou de cession de licence.

Les recettes qui seront éventuellement perçues par BT au titre de la propriété industrielle seront reversées par tiers à la Région, au Département et au Grand Dijon jusqu'à concurrence de la subvention attribuée.

Article 6 : Personnel non permanent :

Si BT est amené à recruter du personnel temporaire pour l'exécution des programmes, ce personnel est assujéti aux mêmes obligations que le personnel permanent, notamment en matière de confidentialité. BT devra assumer seul, à l'égard de ce personnel temporaire, toutes les obligations incombant à l'employeur telles qu'elles sont prévues par la législation en vigueur sur le travail et la main d'œuvre notamment celles liées à la durée du contrat de travail.

Article 7 : Résiliation de la convention :

La présente convention sera résiliée de plein droit par l'une des parties en cas d'inexécution par une des autres parties d'une ou plusieurs des obligations contenues dans ses diverses clauses. Cette résiliation ne deviendra effective que trois mois après l'envoi par la partie plaignante d'une lettre recommandée avec avis de réception, exposant les motifs de la plainte. L'exercice de cette faculté de résiliation ne dispense pas la partie défaillante de remplir les obligations contractées jusqu'à la date de prise d'effet de la résiliation et ce, sous réserve des dommages éventuellement subis par la partie plaignante du fait de la résiliation anticipée du contrat.

Article 8 : Litiges :

En cas de litige entre BT, l'Entreprise et l'Université de Bourgogne, la responsabilité de La Région, du Département ni du Grand Dijon ne pourra être engagée.

Article 9 : Durée de la convention :

La présente convention est conclue pour une durée de 3 ans à compter de sa date de signature, conformément au calendrier d'exécution joint en annexe. Une prolongation supplémentaire peut être demandée par écrit à la Région, au Département et au Grand Dijon pour mener à bien le contrat.

Le compte-rendu final des travaux visé à l'article 4, sera adressé à la Région, au Département et au Grand Dijon dans un délai de six mois après l'expiration de la présente convention.

Article 10 : Suivi des travaux :

Les différentes étapes du projet seront évaluées en continu par un comité créé à cet effet et rassemblant des représentants désignés par chaque signataire de la présente convention.

Par ailleurs, BT adressera chaque année à la Région, au Département et au Grand Dijon un compte-rendu intermédiaire des travaux réalisés.

**Fait à Dijon, le
En 5 exemplaires originaux.**

Le Président
Du Conseil Régional de Bourgogne

Le Directeur général
De LABORATOIRES FOURNIER SA

François PATRIAT

Pierre MOUSTIAL

Le président
Du Conseil général de la Côte d'Or

Le Président
De Bourgogne- Technologies

Louis de BROISSIA

Jean-Paul LEQUIN

Le Président de la Communauté
De l'agglomération dijonnaise

François REBSAMEN

Recherche-Transfert de technologie-Innovation

VU pour être annexé à délibération
du Conseil d'Administration du 18 MAI 2005

1.-Fiche descriptive

DIJON, le 18 MAI 2005
LE PRESIDENT,
COMMUNAUTE
DE
L'AGGLOMERATION
DIJONNAISE

PRÉFECTURE DE LA SEINE-SAINT-DENIS
DÉPOSÉ LE 18 MAI 2005

CONTRAT D'ETUDE ①				
Recherche <input type="checkbox"/>				
Transfert de technologie <input type="checkbox"/>				
Maître d'ouvrage (désignation, statut, adresse)	BOURGOGNE TECHNOLOGIES (Association loi 1901) 8 avenue Jean Bertin - Parc Technologique BP 66517 21065 DIJON Cedex Mail : courrier@btechno.com			
Nom du laboratoire et personne responsable de l'opération (nom, adresse, téléphone, fax, Email)	Pr. Eric SOLARY / Pr. Philippe GAMBERT esolary@u-bourgogne.fr / Philippe.Gambert@chu-dijon.fr IFR 100 « Athérome / Cancer » Responsable de l'opération : Dr David MASSON David.Masson@chu-dijon.fr Faculté de Médecine 7 Bd Jeanne d'Arc – BP 87900 – 21079 DIJON CEDEX Tél : 03.80.39.32.63 Fax : 03.80.39.34.47			
Programme de recherche (objet de la subvention)	Développement pré-clinique de ligands des récepteurs nucléaires (notamment dans l'application anticancéreuse)			
Durée de l'opération	3 ans			
Coût TOTAL de l'opération en € TTC (arrondi en milliers d'€)	741 520 €			
Montant de la subvention demandée sur la TOTALITE de l'opération (arrondi en milliers d'euros) 50 % maximum du coût	230 000 €			
Autres financements (indiquer le nom du ou des partenaires économiques cofinanceurs, le montant de leur(s) participation(s) et si le financement est acquis ou prévu)	<u>Cofinancier</u>	<u>Montant</u>	<u>Acquis</u>	<u>Prévu</u>
	ANRT	43 905		X
	Conseil Général	230 000		X
	Conseil Régional	230 000		X

① Cocher la case

2.-THEMATIQUE DU LABORATOIRE

(description en 2 pages maximum de la thématique du laboratoire, des objectifs poursuivis à moyen terme, des collaborations nationales et internationales...) – Adéquation de la demande avec cette thématique

Présentation de Bourgogne Technologies

Créée en novembre 1984, sur l'initiative du Conseil Régional de Bourgogne et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, BOURGOGNE TECHNOLOGIES est une association Loi 1901 qui coordonne des projets de transfert technologique en région Bourgogne. Ses membres sont des industriels, des institutionnels et des chercheurs.

Centre de développement au service notamment des PME-PMI, BOURGOGNE TECHNOLOGIES fait appel à l'ensemble des compétences que l'on peut réunir en Bourgogne, qu'elles soient universitaires ou industrielles, pour l'optimisation et le développement de produits et de procédés. BOURGOGNE TECHNOLOGIES fédère l'activité de deux CRITT (Centre Régional d'Innovation et de Transfert Technologique), dont le CRITT Agro-Alimentaire et Bio-Industriel (CRITT 2ABI).

Dans le cadre du Contrat de Plan, et plus particulièrement des volets Recherche et Transfert de Technologie, l'activité du CRITT 2ABI est soutenue par l'Etat et par le Conseil Régional de Bourgogne.

Les domaines technologiques du CRITT 2ABI appartiennent aux Sciences de la Vie. Ils recouvrent les activités de transformation agro-alimentaire et les biotechnologies. Ainsi, le CRITT 2ABI favorise le transfert technologique et la recherche appliquée au bénéfice des industriels des domaines agro-alimentaire et bio-industriel. Il développe des compétences sur quatre thèmes, qui ont des applications dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et biomédical :

- La texturation de substrats alimentaires et/ou biologiques par traitements thermomécaniques.
- L'aromatisation et la désaromatisation.
- La décontamination de produits pulvérulents.
- Les procédés de fermentation et la culture cellulaire animale.

Pour conforter le développement de ces axes de compétence, le CRITT 2ABI travaille en partenariat étroit avec les organismes de recherche de l'Université de Bourgogne, et en particulier des laboratoires de l'ENSBANA, de la faculté de Médecine et de Pharmacie, ainsi que des IUT. En outre, le CRITT 2ABI a développé des collaborations importantes avec l'INRA et l'ENESAD (UMR).

Le CRITT possède une structure propre (Hall de Technologie Alimentaire), avec principalement une activité agro-alimentaire.

Dans le domaine bio-industriel (biotechnologies, pharmacie, biomédical), des plates-formes sont associées à Bourgogne Technologies dans le cadre de conventions (Université de Bourgogne, INRA). Des personnels de Bourgogne Technologies y sont détachés (ingénieurs et techniciens). Dans ce cadre, Bourgogne Technologies est amenée à faire appel aux compétences scientifiques et techniques de différents laboratoires de la Faculté de Médecine et du Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) du Bocage à Dijon, dans les domaines des maladies infectieuses, de la virologie, des maladies métaboliques, de la cancérologie ou de la cardiologie.

Dans le cas présent, il est fait appel aux compétences de l'IFR 100 (Athérome et Cancer), qui regroupe différents laboratoires dont ceux du Pr. Eric SOLARY et du Pr. Philippe GAMBERT.

Présentation du projet de l'IFR100

L'I.F.R. 100 s'est donné quatre objectifs :

1 - Favoriser le développement de projets transversaux. Depuis la création de l'IFR, 3 thèmes structurants sont développés. Le premier est *l'épidémiologie biologique* associant l'EPI0106 INSERM aux équipes de cancérologie (épidémiologie des cancers coliques en Côte d'Or - étude PHRC) et de biochimie (Etude INSERM dite "des 3 cités" concernant les accidents vasculaires cérébraux). La plateforme de protéomique en cours d'installation ouvre de nouvelles perspectives dans ce domaines. Le second est *la régulation de la mort cellulaire* centrée sur deux familles de protéines, les caspases (transcription, modifications post-traductionnelles, localisation subcellulaire) et les protéines de choc thermique dans des modèles variés : apoptose des cellules tumorales (réponse aux cytotoxiques et réponse immune anti-tumorale), rôle des oxystérols dans la mort des cellules endothéliales (athérome) et apoptose des cellules myocardiques dans un modèle d'ischémie/reperfusion. Le troisième est l'étude du *monoxyde d'azote et des espèces radicalaires de l'oxygène*, dans la réponse antitumorale générée par un lipide A et les processus d'adaptation à des situations d'ischémie. Le *projet en collaboration avec Fournier Pharma* qui fait l'objet de ce dossier fera intervenir les unités Inserm U498 et U517.

2 - Mettre en commun les moyens de développer ces projets :

Le projet mort cellulaire s'appuie sur des méthodes de microscopie, de cytométrie, d'électrophorèse 2D et de spectrométrie de masse : toutes ces technologies ont été progressivement organisées en service commun au cours des 4 dernières années. Nous avons obtenu de l'Université de Bourgogne la redistribution de 2 postes (technicien et ingénieur) au profit de l'IFR N°100. Nous avons pris en main la gestion du centre de cytométrie de l'Université de Bourgogne, auquel est associé un poste d'ingénieur de recherche. La vidéomicroscopie a été installée en 2003, la plateforme de protéomique en 2004.

3 - Organiser une animation scientifique sur le site : Confiée au Conseil Scientifique de l'IFR présidé par Gerard Lizard (CR INSERM), cette animation scientifique comporte des journées de l'IFR, des conférences mensuelles sur un sujet d'intérêt commun par un conférencier extérieur, des conférences internes et des sessions de formation à des techniques nouvelles pour les chercheurs et les étudiants.

4 - Accueillir progressivement de nouvelles équipes : L'IFR accueille depuis janvier 2003 le CIC à orientation méthodologique et épidémiologique (label INSERM/DHOS) qu'il avait souhaité voir émerger depuis 2000. Nous accueillons l'équipe universtaire dirigée par Christine Marie et de nouvelles ouvertures vers d'autres équipes universitaires sont envisagées. L'association au pôle de recherche clinique du CHU et des collaborations avec des équipes de Besançon (80 kms) ont été initiées.

Mots clés : *Athérome, Cancer, Leucémies, Epidémiologie, Biologie Cellulaire, Biologie Moléculaire, Biochimie, Lipoprotéines, Apoptose, Réponse immunitaire antitumorale, Signalisation intracellulaire, Métabolisme oxydatif, Monoxyde d'azote.*

Composition en unités constituanes

1. Appartenance INSERM / Université de Bourgogne Directeur : Philippe GAMBERT
n° éventuel : Unité 498
Intitulé : Métabolisme des lipoprotéines
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon
nombre d'équipes : 5 nombre de personnels de l'unité:12
2. Appartenance INSERM / Université de Bourgogne Directeur : Eric SOLARY
n° éventuel : Unité 517
Intitulé : Mort Cellulaire et Cancer
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 5..... nombre de personnels de l'unité: 14
3. Appartenance INSERM / Université de Bourgogne Directeur : Claire BONITHON-KOPP
n° éventuel : EPI 0106
Intitulé : Recherches Epidémiologiques et Cliniques en Cancérologie Digestive
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 1..... nombre de personnels de l'unité: 6.6
4. Appartenance Université de Bourgogne Directeur : Luc ROCHETTE
n° éventuel : EA 2979
Intitulé : Physiologie et Physiopathologie Cardiovasculaires Experimentales (LPPCE)
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 3..... nombre de personnels de l'unité: 7.1
5. Appartenance Université de Bourgogne Directeur : Jean FAIVRE
n° éventuel
Intitulé Centre d'Epidémiologie des Populations regroupant le Registre Bourguignon des Cancers Digestifs,
le Registre des Hémopathies Malignes de la Côte d'Or, le Registre Dijonnais des Accidents Vasculaires
Cérébraux, le Registre des Hépatites Virales et Climat et Santé
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 5.....Nombre de personnels de l'unité: 6
6. Appartenance INSERM / Université de Bourgogne Directeur : Claire BONITHON-KOPP
n° éventuel : CICEC
Intitulé : Etudes épidémiologie et méthodologie des essais cliniques
Adresse : UFR de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 1.....Nombre de personnels de l'unité:
7. Appartenance Université de Bourgogne Directeur : Christine MARIE
n° éventuel : EA 3659
Intitulé : Laboratoire de Pharmacodynamie et Physiologie Pharmaceutique
Adresse : UFR des Sciences Pharmaceutiques, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon,
nombre d'équipes 1.....Nombre de personnels de l'unité:
8. CHU Dijon : Pôle de Recherche clinique Directeur : Pr Jean-Pierre DIDIER
n° éventuel : Aucun
Intitulé : Pôle de Recherche Clinique du CHU de Dijon
Adresse : Direction Qualité/Recherche, CHU Le Bocage, BP1542, 21034 Dijon cedex
nombre d'équipes 4..... Nombre de personnels de l'unité:

3.-LISTE DES PUBLICATIONS, DES BREVETS ET, LE CAS ECHEANT, DES OPERATIONS DE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE DES 3 DERNIERES ANNEES

(n'indiquez que les publications indexées dans Current Contents des participants au programme : références complètes)

Sélection des 6 principales publications par unité constituante et de publications transversales

INSERM U498

GAUTIER T, MASSON D, JONG MC, DUVERNEUIL L, LE GUERN N, DECKERT V, PAIS DE BARROS JP, DUMONT L, BATAILLE A, ZAK Z, JIANG XC, TALL AR, HAVEKES LM, LAGROST L Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice. **Journal of Biological Chemistry.** (2002) 277, 31354-63

BESSEDE G, MIGUET C, GAMBERT P, NÉEL D, and LIZARD G. Efficiency of homocysteine plus copper in inducing apoptosis is inversely proportional to gamma-glutamyl transpeptidase activity. **FASEB Journal** (2001) 15, 1927-1940.

JIANG XC, TALL AR, QIN S, LIN M, SCHNEIDER M, LALANNE F, DECKERT V, DESRUMAUX C, ATHIAS A, WITZTUM JL, LAGROST L. Phospholipid transfer protein deficiency protects circulating lipoproteins from oxidation due to the enhanced accumulation of vitamin E. **Journal of Biological Chemistry** (2002) 277, 31850-6.

MIGUET-ALFONSI C, PRUNET C, MONIER S, BESSEDE G, LEMAIRE-EWING S, BERTHIER A, MENETRIER F, NEEL D, GAMBERT P, LIZARD G. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. **Biochemical Pharmacology** (2002) 64, 527-41

MASSON D, STAELS B, GAUTIER T, DESRUMAUX C, ATHIAS A, LE GUERN N, SCHNEIDER M, ZAK Z, DUMONT L, DECKERT V, TALL A, JIANG XC, LAGROST L. Cholesteryl ester transfer protein modulates the effect of liver X receptor agonists on cholesterol transport and excretion in the mouse. **J Lipid Res.** 2004;45:543-50.

BERTHIER A, LEMAIRE-EWING S, PRUNET C, MONIER S, ATHIAS A, BESSEDE G, PAIS DE BARROS JP, LAUBRIET A, GAMBERT P, LIZARD G, NEEL D. Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. **Cell Death Differ.** 2004 Apr 23

INSERM U517

BRUEY, J.M., DUCASSE, C., BONNIAUD, P., RAVAGNAN, L., SUSIN, S.A., DIAZ-LATOUD, C., GURBUXANI, S. ARRIGO, P., KROEMER, G., SOLARY, E., and GARRIDO, C. HSP27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome-C. **Nature Cell Biology**, 2000, 2: .645-65

BONNOTTE B, LARMONIER N, FAVRE N, FROMENTIN A, MOUTET M, MARTIN M, GURBUXANI S, SOLARY E, CHAUFFERT B, MARTIN F. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. **Journal of Immunology.** 2001, 167, 5077-83.

RAVAGNAN L, GURBUXANI S, SUSIN SA, MAISSE C, DAUGAS E, ZAMZAMI N, MAK T, JAATTELA M, PENNINGER JM, KROEMER G, GARRIDO C Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. **Nature Cell Biology**, 2001, 3, 839-43

MILLET A, BETTAIEB A, RENAUD F, PREVOTAT L, HAMMANN A, SOLARY E, MIGNOTTE B, JEANNIN JF. Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells. **Gastroenterology.** 2002, 123, 235-46

DUCOROY P, MICHEAU O, PERRUCHE S, DUBREZ-DALOZ L, DE FORNEL D, DUTARTRE P, SAAS P, SOLARY E. LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. **Blood.** 2003;10, 194-201

PARCELLIER A, SCHMITT E, GURBUXANI S, SEIGNEURIN-BERNY D, PANCE A, CHANTOME A, PLENCHETTE S, KHOCHBIN S, SOLARY E, GARRIDO C. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. **Mol Cell Biol**, 2003, 23, 5790-5802

EPI-0106

BONITHON-KOPP C, KRONBORG O, GIACOSA A, RÁTH U, FAIVRE J. Calcium and fibre supplementation in the prevention of colorectal adenoma recurrence: a Placebo-controlled Intervention Trial from the European Cancer Prevention Organisation (ECP). **Lancet** 2000, 356, 1300-6

CHAPLAIN G, MILAN C, SGRO C, CARLI PM, BONITHON-KOPP C. Increased risk of acute leukemia after adjuvant chemotherapy for breast cancer: a population-based study. **Journal of Clinical Oncology** 2000, 18, 2836-42

JOUVE JL, REMONTET L, DANCOURT V, LEJEUNE C, BENHAMICHE AM, FAIVRE J, ESTÈVE J. Estimation of screening test (Hemocult) sensitivity in colorectal cancer mass screening. **British Journal of Cancer** 2001;84:1477-81

CHAPUSOT C, MARTIN L, BOUVIER AM, BONITHON-KOPP C, ECARNOT-LAUBRIET A, RAGEOT D, PONNELLE T, LAURENT PUIG P, FAIVRE J, PIARD F. Microsatellite instability and intratumoural heterogeneity in 100 right-sided sporadic colon carcinomas. **British Journal of Cancer.** 2002, 87, 400-4

LEJEUNE C, ARVEUX P, DANCOURT V, FAGNANI F, BONITHON-KOPP C, FAIVRE J. A simulation model for evaluating the medical and economic outcomes of screening strategies for colorectal cancer. **European Journal of Cancer Prevention.** 2003, 12, 77-84

BONITHON-KOPP C, PIARD F, FENGER C, CABEZA E, O'MORAIN C, KRONBORG O, FAIVRE J; EUROPEAN CANCER PREVENTION ORGANISATION STUDY GROUP. Colorectal adenoma characteristics as predictors of recurrence. **Dis Colon Rectum.** 2004 Mar;47(3):323-33

COTTIN Y., BERRIOLO A., GUY F., TOUBEAU M., BELLEVILLE L., BRENOT R., BRUNOTTE F., WOLF J.-E. Somatostatin-receptor scintigraphy identifies a cardiac pheochromocytoma. **Circulation** (1999) 100:2387-8.

BARDOU M., LOUSTALOT C., CORTIJO J., SIMON B., NALINE E., DUMAS M., ESTEVE S., CROCI T., CHALON P., FRYDMAN R., SAGOT P., MANARA L., MORCILLO E.-J. AND ADVENIER C. Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible beta₃-adrenoceptor in human term myometrium **British Journal of Pharmacology** (2000) 130:1960-6.

VERGELY C., TABARD A., MAUPOIL V. AND ROCHETTE L. Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury. Cardiovascular effects of the spin trap alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron. **Free Radical Research** (2001) 35:475-89.

BARDOU M., GOIRAND F., BERNARD A., GUERARD P., GATINET M., DEVILLIER P., DUMAS JP, MORCILLO EJ, ROCHETTE L, DUMAS M Relaxant effects of selective phosphodiesterase inhibitors on U46619 precontracted human intralobar pulmonary arteries and role of potassium channels. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. (2002) 40:153-61

ODOT A., VERGELY C., ECARNOT-LAUBRIET A., ROCHETTE L. Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. **European Journal of Pharmacology**. (2003) 462 :145-54.

VERGELY C., GOIRAND F., ECARNOT-LAUBRIET A., RENARD C., MOREAU D., GUILLAND JC, DUMAS M, ROCHETTE L. Vitamin C deficiency exerts paradoxical cardiovascular effects in osteogenic disorder Shionogi (ODS) rats. **J Nutr**. 2004 Apr;134(4):729-35

Centre d'épidémiologie des populations

CONFAVREUX C, VUKUSIC S, MOREAU T, ADELEINE P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. **New England Journal of Medicine**. 2000, 343, 1430-8.

CHAPLAIN G, QUANTIN C, BRUNET-LECOMTE P, MOTTOT C, MICHIELS-MARZAIS D, SASCO AJ. Quality assessment of cervical screening: a population-based case-control study in the Côte-D'Or region, France. **Cancer Detection & Prevention** 2001, 25, 40-7

MAYNADIE M, PICARD F, HUSSON B, CHATELAIN B, CORNET Y, LE ROUX G, CAMPOS L, DROMELET A, LEPALLEY P, JOUAULT H, IMBERT M, ROSENWADJ M, VERGE V, BISSIERES P, RAPHAEL M, BENE MC, FEUILLARD J Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2002, 100, 2349-56

MEGHERBI SE, MILAN C, MINIER D, COUVREUR G, OSSEBY GV, TILLING K, DI CARLO A, INZITARI D, WOLFE CD, MOREAU T, GIROUD M Association between diabetes and stroke subtype on survival and functional outcome 3 months after stroke: data from the European BIOMED Stroke Project. **Stroke**. 2003, 34, 688-94

DUTRILLAUX F, MAYNADIE M, CARLI PM. Low-dose aspirin in polycythemia vera. **N Engl J Med**. 2004 Apr 15;350(16):1683-5

Laboratoire de Pharmacodynamie et Physiologie Pharmaceutique - EA 3659

DEMOUGEOT C ET AL (2003) Effects of a direct injection of liposoluble iron into rat striatum. Importance of the rate of iron delivery to cells. **Free Rad Res**, 37, 59-67

DEMOUGEOT C ET AL (2003) Reversible loss of N-acetyl-L-aspartate in rats subjected to long term focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, 23, 482-489

MÉTHY ET AL (2004) Differential MnSOD and HO-1 expression in cerebral endothelial cells in response to sublethal oxidative stress. **Brain Res**, 1003, 151-8

DEMOUGEOT C ET AL (2004) Effect of diets with different magnesium content in ischemic stroke rats. **Neurosci Lett**. 362, 17-20.

MOSSIAT ET AL (2003) Effects of iNOS-related NO on hearts exposed to liposoluble iron. **Free Rad Res**, 37, 749-756

GARNIER ET AL (2004, à paraître) Hypoxia induces caspase-9 and caspase-3 activation without neuronal death in gerbils brain. **Eur J Neurosci**

- CEP + EPI0106** - CHAPLAIN G, MILAN C, SGRO C, CARLI PM, BONITHON-KOPP C. Increased risk of acute leukemia after adjuvant chemotherapy for breast cancer: a population-based study. *J Clin Oncol*. 2000, 15, 2836-42
- CEP + LPPE** - LEMESLE M., WALKER P.M., GUY F., D'ATHIS P., BILLIAR T., GIROUD M., LALANDE A., BAUDOIN N., MARTIN D. AND BRUNOTTE F. Multivariate analysis predicts clinical outcome 30 days after middle cerebral artery infarction. *Acta Neurol Scand* 2000, 102, 11-7
- CPE + LPPCE** - LEMESLE M., BERRIOLO-RIEDINGER A., TOUZERY C., GUY F., TOUBEAU M., CREVENAT E., URBINELLI R., OSSEBY G., BRUNOTTE F. AND GIROUD M. Correlation between inter-ictal regional cerebral blood flow and sphenoidal electrodes recorded inter-ictal spikes in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurol. Res.* 2000, 22:674-8
- EPI0106 + U498** - PETIT J.M., BOUR J.B., GALLAND-JOS C., MINELLO A., VERGES B., GUIGUET M., BRUN J.M. and HILLON P. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2001, 35, 279-283.
- U517 + LPPCE** - FAVOULET P, MAGNIN G, GUILLAND JC, BELTRAMO JL, OSMACK L, BENOIT L, RAT P, DOUVIER S, DUVILLARD C, CHAUFFERT B. Pre-clinical study of the epinephrine-cisplatin association for the treatment of intraperitoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*. 2001, 27, 59-64.
- EPI0106 + LPPCE** - CLINARD F., SGRO C., BARDOU M., DUMAS M., HILLON P. AND BONITHON-KOPP C. Non steroidal anti-inflammatory drug prescription patterns in general practice: comparison of a general practitioner-based survey and a pharmacy-based survey in France. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2001, 10:329-38
- U517 + U498** - SORDET O., REBE C., LEROY I., BRUEY J.M., GARRIDO C., MIGUET C., LIZARD G., PLENCHETTE S., CORCOS L. and SOLARY E. Mitochondria-targeting drugs arsenic trioxide and lonidamine bypass the resistance of TPA-differentiated leukemic cells to apoptosis. *Blood* 2001, 97, 3931-3940.
- U517 + U498** - MIGUET C., MONIER S., BETTAIEB A., ATHIAS A., BESSEDE G., LAUBRIET A., LEMAIRE S., NÉEL D., GAMBERT P. and LIZARD G. Ceramide generation occurring during 7 β -hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death and Differentiation* 2001, 8, 83-99.
- LPPCE + U517** - ECARNOT-LAUBRIET A, ASSEM M, POIRSON-BICHAT F, MOISANT M, BERNARD C, LECOUR S, SOLARY E, ROCHETTE L, TEYSSIER JR. Stage-dependent activation of cell cycle and apoptosis mechanisms in the right ventricle by pressure overload. *Biochimica Biophysica Acta*. 2002, 1586, 233-42.
- U517 + EPI0106** - SERGENT C, FRANCO N, CHAPUSOT C, LIZARD-NACOL S, ISAMBERT N, CORREIA M, CHAUFFERT B. Human colon cancer cells surviving to high dose of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49, 445-52
- U498 + IFR100** - MIGUET-ALFONSI C., PRUNET C., MONIER S., BESSEDE G., LEMAIRE-EWING S., BERTHIER A., MENETRIER F., NÉEL D., GAMBERT P. and LIZARD G. Analysis of oxidative processes and myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 β -hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochemical Pharmacology* (2002) 64, 527-41
- EPI106 + LPPCE** : CHAPUSOT C, MARTIN L, BOUVIER AM, BONITHON-KOPP C, ECARNOT-LAUBRIET A, RAGEOT D, PONNELLE T, LAURENT PUIG P, FAIVRE J, PIARD F. Microsatellite instability and intratumoural heterogeneity in 100 right-sided sporadic colon carcinomas. *British Journal of Cancer*. 2002, 87, 400-4.
- U498 + LPPCE** : MONIER S, SAMADI M, PRUNET C, DENANCE M, LAUBRIET A, ATHIAS A, BERTHIER A, STEINMETZ E, JURGENS G, NEGRE-SALVAYRE A, BESSEDE G, LEMAIRE-EWING S, NÉEL D, GAMBERT P, LIZARD G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr 11;303(3):814-24.
- U517 + U498** : DELMAS D, REBE C, LACOUR S, FILOMENKO R, ATHIAS A, GAMBERT P, CHERKAOUI-MALKI M, JANNIN B, DUBREZ-DALOZ L, LATRUFFE N, SOLARY E. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41482-90.
- U517 + U498** : LACOUR S, GRAZIDE S, HAMMANN A, LAGADIC-GOSSMANN D, ATHIAS A, SERGENT O, LAURENT G, GAMBERT P, SOLARY E, DIMANCHE-BOITREL MT. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research*. 2004;64:3593-8.
- U517 + LPPCE** : CHANTÔME A, PANCE A, GAUTHIER N, VANDROUX D, CHENU J, SOLARY E, JEANNIN JF, REVENEAU S. Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF- κ B p65 subunit enhances inducible nitric oxide synthase gene transcription in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:23953-23960
- U517 + LPPCE** : GAUTHIER N, LOHM S, TOUZERY C, CHANTOME A, PERETTE B, REVENEAU S, BRUNOTTE F, JULLERAT-JEANNERET L, JEANNIN JF. Tumor-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lungs. *Carcinogenesis*. 2004 Apr 1 [epub]
- U517 + EPI106** : DUVILLARD C, PONNELLE T, CHAPUSOT C, PIARD F, ROMANET P, CHAUFFERT B. Prevention of peritoneal carcinomatosis from colon cancer cell seeding using a pirarubicin solution in rats and nude mice. *World J Surg*. 2004;28:451-6.
- U517 + EPI106** : PONNELLE T, CHAPUSOT C, MARTIN L, BONITHON-KOPP C, BOUVIER AM, PLENCHETTE S, RAGEOT D, FAIVRE J, SOLARY E, PIARD F. Subcellular expression of c-IAP1 and c-IAP2 in colorectal cancers: relationships with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract*. 2003;199(11):723-31
- LPPCE + EPI106** : CLINARD F, SGRO C, BARDOU M, HILLON P, DUMAS M, KREFT-JAIS C, ESCOUSSE A, BONITHON-KOPP C. Association between concomitant use of several systemic NSAIDs and an excess risk of adverse drug reaction. A case/non-case study from the French Pharmacovigilance system database. *Eur J Clin Pharmacol*. 2004

4.-EXPOSE DU PROGRAMME

(5 pages maximum)

Préambule

Les laboratoires Fournier (Fournier Pharma) sont engagés depuis quelques années dans un programme de recherche sur les récepteurs nucléaires et les maladies métaboliques. Fournier Pharma a mis en place une plateforme technologique spécifique incluant des outils de criblage à haut rendement en biologie et métabolisme ainsi que des outils de modélisation moléculaire, des bioessais permettant l'étude des coactivateurs de ces récepteurs et a développé la technique de siRNA pour comprendre leur rôle. Fournier Pharma, à partir de ses librairies de composés, a synthétisé des molécules se liant à ces récepteurs nucléaires et en particulier des **ligands des récepteurs LXRs** dont l'utilisation thérapeutique envisagée est le traitement de l'athérosclérose. Ces substances ont comme principale cible le macrophage, qui joue un rôle pivot dans le développement de la plaque d'athérome. Ces macrophages dérivent de cellules appelées monocytes qui circulent dans le sang. Les ligands LXR produisent un efflux de cholestérol hors de cette cellule et par ce mécanisme devrait antagoniser ou même réverser le développement de la plaque athéromateuse. Les molécules actuellement sur le marché (statines et fibrates) agissent essentiellement en diminuant les lipides circulants alors que les ligands LXRs produisent un effet directement sur la cellule cible ainsi qu'un transport reverse du cholestérol vers sa métabolisation au niveau hépatique. Les ligands LXRs et d'autres ligands d'autres récepteurs nucléaires développés par Fournier Pharma agissent également sur des voies métaboliques qui pourraient jouer un rôle dans le développement d'autres pathologies dont le cancer. Fournier Pharma est intéressé par une collaboration avec l'IFR 100 pour :

- d'une part développer des marqueurs d'activité de ses ligands,
- d'autre part rechercher les effets de ses ligands sur les processus de cancérisation et le développement de certaines tumeurs afin d'exploiter au mieux le développement de ses produits.

L'IFR100 de l'Université de Bourgogne se propose de mettre en œuvre un programme de recherche de 3 ans qui comporte deux volets :

- Le premier concerne l'**identification de marqueurs précoces de réponse aux molécules étudiées** en se focalisant sur les effets de ces molécules au niveau des monocytes circulants.
- Le second concerne l'**intérêt potentiel de ces molécules en cancérologie** avec la recherche d'un effet cytotoxique ou chimiosensibilisant.

Ces deux volets seront explorés **simultanément** par 3 équipes constituées chacune d'un chercheur et d'un technicien, mis à disposition des laboratoires de l'IFR 100 par Bourgogne Technologies, ainsi que par un thésard bourse CIFRE recruté spécifiquement sur ce programme :

- Equipe 1 : Etudes du transcriptome et de l'expression génique (3 ans).
- Equipe 2 : Etudes du protéome (3 ans).
- **Equipe 3 : Effets sur les cellules cancéreuses (à partir de l'année 2), qui fait l'objet de la présente demande.**

L'ensemble du programme, géré par Bourgogne Technologies, sera coordonné par le docteur David Masson (MCU-PH), avec l'aide d'un Conseil Scientifique constitué des directeurs des Unités Inserm U498 (P. Gambert) et U517 (E. Solary), et de chercheurs des laboratoires Fournier Pharma coordonnés par Jean-Louis Junien, avec l'aide de Pierre Broqua.

Des chercheurs Inserm de l'IFR100 interviendront au titre de consultants (C. Garrido, C. Desrumaux). Dans un souci d'efficacité maximale, une partie de l'activité de recherche sera réalisée en sous-traitance par des laboratoires privés (Oncodesign SA, Dijon) ou au sein de plate-formes extérieures à l'Université de Bourgogne ("Transcriptome", Institut Gustave Roussy, Villejuif).

Ce programme a pour objectif d'accompagner, voire d'initier des études cliniques des molécules élaborées par Fournier Pharma, en collaboration avec les équipes cliniques du CHU de Dijon et des équipes extérieures si besoin.

I - Problématique scientifique

I.1. Intérêt des récepteurs nucléaires en tant que cible thérapeutique.

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs transcriptionnels qui ont la particularité d'être activés par liaison avec un ligand spécifique¹. Ils se fixent sur des motifs particuliers de l'ADN dans les régions promotrices de gènes cibles. Cette fixation contribue le plus souvent à l'activation de l'expression de ces gènes cibles, plus rarement à l'inhibition de leur expression. Très schématiquement on peut distinguer les récepteurs "classiques" aux hormones (Classe I) et les récepteurs nucléaires dits "orphelins" (Classe II).

- Les premiers possèdent des ligands de haute affinité et très spécifiques. Ces ligands sont le plus souvent produits de manière endogène par des cellules spécialisées (hormones).
- Les récepteurs de classe II possèdent des ligands de plus faible affinité et sont capables de se lier à un certain nombre de molécules qui n'ont pas toujours une structure chimique commune. Ils se lient à l'ADN sous forme d'hétérodimères avec le récepteur nucléaire aux rétinoïdes (RXR).

D'une manière remarquable, les ligands des récepteurs de classe II sont en général des produits de la voie métabolique contrôlée par le récepteur nucléaire considéré. Les récepteurs nucléaires ont donc la capacité de réagir à l'accumulation de molécules en excès et d'activer au niveau transcriptionnel des mécanismes compensateurs. Les récepteurs orphelins ont logiquement suscité un énorme intérêt au cours de ces dernières années car ils interviennent dans le contrôle de voies métaboliques majeures comme celles du cholestérol, des acides biliaires ou des acides gras. Or, ces voies sont altérées dans de nombreuses situations pathologiques et les récepteurs de classe II constituent une cible pharmacologique facilement accessible, suggérant la possibilité de nouvelles approches thérapeutiques dans les maladies métaboliques².

Des agonistes de certains récepteurs nucléaires sont déjà utilisés en thérapeutique humaine. Les fibrates, par exemple, sont des ligands du récepteur nucléaire PPAR alpha (récepteur activant la prolifération des peroxyosomes) qui sont utilisés dans le traitement des dyslipidémies. Plus récemment les thiazolidinediones, ligands de PPAR gamma, ont été introduits dans le traitement du diabète de type II. D'autre part, des ligands pharmacologiques de LXR (Liver X receptor) et d'autres ligands potentiels des récepteurs nucléaires sont en cours de développement pré-clinique^{3 4}. Fournier Pharma a identifié un certain nombre de molécules capables de moduler l'activité de récepteurs nucléaires, et notamment de LXR. Le projet proposé s'inscrit dans ce contexte.

I.2. Les récepteurs nucléaires LXR : nouvelles cibles thérapeutiques dans la prévention de l'athérosclérose.

Les récepteurs nucléaires LXR sont des membres de la classe II de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils ont été identifiés par criblage de banques d'ADN complémentaires⁵. Deux récepteurs ont été décrits, LXR alpha (NR1H3) et LXR bêta (NR1H2). Ces deux protéines possèdent une forte homologie de séquence (78 %). En revanche, elles n'ont ni le même mode de régulation, ni la même distribution tissulaire.

- LXR alpha est principalement produit au niveau du foie, du tissu adipeux et du macrophage.
- LXR bêta est produit de manière ubiquitaire.

¹Mangelsdorf D.J., Evans R.M. (1995) *Cell* 83: 841-850

² Handschin C., Meyer UA. (2005) *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 387-396.

³ Bocher V, Millatt LJ, Fruchart JC, Staels B. (2003). *Curr. Opin. Lipidol.* 14:137-143.

⁴ Joseph SB, Tontonoz P. (2003) *Curr. Opin. Pharmacol.* 14:192-197.

⁵ Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. (1996) *Nature* 383:728-731

Les ligands naturels de LXR sont des dérivés oxydés du cholestérol, plus spécifiquement le 22(R) hydroxycholestérol, le 20(S) hydroxycholestérol, le 24-25 époxycholestérol et dans une moindre mesure le 27 hydroxycholestérol⁴. Ces molécules sont produites naturellement dans l'organisme à partir du cholestérol et à des concentrations suffisantes pour activer LXR.

In vivo LXR peut donc répondre à une surcharge de l'organisme en cholestérol. Son activation met en jeu des mécanismes compensateurs à au moins trois niveaux :

- diminution de la synthèse cellulaire de cholestérol,
- diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire,
- et surtout stimulation du transport reverse du cholestérol via :
 - o 1) l'augmentation de l'efflux du cholestérol cellulaire au niveau périphérique (induction des transporteurs ABCA-I/ABCG1)
 - o 2) l'activation de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) au niveau plasmatique
 - o 3) la stimulation de la synthèse hépatique d'acides biliaires et de l'excrétion biliaire du cholestérol (Cyp 7A1 et ABCG5G8)^{1 2 3 4 5}.

L'intérêt thérapeutique potentiel d'agonistes LXR apparaissait donc évident. Des agonistes pharmacologiques de LXR (T0901317, GW 3965) ont été développés et testés sur des modèles animaux. Ces études ont confirmé le rôle de LXR dans le métabolisme du cholestérol et ont mis en évidence le rôle bénéfique des agonistes LXR dans la prévention de l'athérosclérose^{6 7}. Elles ont également révélé que les LXR exerçaient des actions multiples dans d'autres domaines (inflammation, lipogénèse, métabolisme du glucose, immunité..) et que l'activation de ces voies par LXR pouvait être bénéfique (action anti-inflammatoire au niveau de la plaque d'athérome) mais aussi délétère^{8 9}. Par exemple, la stimulation importante de la lipogénèse par les agonistes LXR chez la souris conduit à une augmentation des taux de triglycérides plasmatiques et à une stéatose hépatique¹⁰.

La recherche s'oriente donc vers l'identification d'agonistes dépourvus des effets indésirables des molécules de la première génération. Cette plus forte spécificité pourrait être obtenue en produisant des molécules agissant préférentiellement sur l'une des deux isoformes (alpha ou beta), sur certains gènes cibles (le métabolisme du cholestérol mais pas la lipogénèse) ou sur certains organes (par exemple le macrophage mais pas le foie).

I.3. Utilisation des agonistes LXR en clinique : quels marqueurs d'efficacité ?

A l'heure actuelle, on considère que des molécules agonistes LXR pourraient avoir un intérêt dans la prévention de l'athérosclérose. Cette hypothèse s'appuie sur l'identification des effets de LXR sur la régulation du métabolisme du cholestérol et la démonstration des effets antiathérogènes des agonistes LXR chez la souris^{6 7}. Les principaux effets attendus des agonistes LXR sont :

- diminution de la synthèse endogène de cholestérol
- diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire

¹ Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. (1998) *Cell* 93:693-704.

² Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:28240-28245

³ Kennedy MA et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:39438-39447.

⁴ Luo Y, Tall AR. (2000) *J. Clin. Invest.* 105:513-520.

⁵ Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:15565-15570.

⁶ Joseph SB, et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:7604-7609.

⁷ Tangirala RK et al. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:11896-11901.

⁸ Laffitte BA, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:5419-5424.

⁹ Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. (2003) *Nat. Med.* 9:213-219.

¹⁰ Schultz JR, et al. (2000) *Genes Dev.* 14:2831-2838.

- stimulation de l'efflux du cholestérol cellulaire notamment à partir des macrophages accumulés au niveau de la plaque d'athérome
- stimulation de l'excrétion biliaire du cholestérol

Les principaux organes cibles des agonistes LXR devraient être l'intestin (diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire) et le macrophage (diminution du contenu en cholestérol et action anti-inflammatoire au niveau de la plaque d'athérome). Au niveau du foie, les effets d'une activation de LXR sont plus ambigus : LXR stimule l'excrétion biliaire du cholestérol mais induit également la lipogenèse avec une augmentation des triglycérides plasmatiques et un risque élevé de stéatose hépatique.

Il est facile de définir des critères d'efficacité d'un traitement à long terme par un agoniste LXR : il s'agit de la diminution des lésions athéromateuses et du risque associé de maladie cardiovasculaire. Mais ces critères ne sont évaluables qu'à long terme et il est donc primordial de disposer de marqueurs précoces de réponse au traitement. C'est un des principaux aspects du projet proposé.

Quels pourraient être ces marqueurs précoces de réponse au traitement par un agoniste LXR ?

1 – Il pourrait s'agir de modifications des lipides plasmatiques : chez la souris, les agonistes LXR entraînent rapidement une augmentation de la concentration du cholestérol plasmatique, due à une augmentation du taux des HDL circulantes. Chez l'homme cependant, du fait de la présence de la CETP (absente chez la souris), les modifications du profil lipoprotéique devraient être minimales puisque l'expression transgénique de la CETP chez la souris annule complètement les effets des agonistes LXR sur les lipoprotéines du plasma ¹. Il est donc prévisible que chez l'homme, un traitement par agoniste LXR n'entraînera pas de modification significative du profil lipoprotéique plasmatique.

2 – Il pourrait s'agir de l'induction de gènes cibles de LXR au niveau de cellules sanguines circulantes. Plus spécifiquement, les monocytes sanguins sont une cible potentielle des agonistes LXR puisque 1) ce sont les précurseurs directs des macrophages qui forment les cellules spumeuses de la plaque d'athérome, 2) ils sont une cible thérapeutique des agonistes LXR qui pourraient moduler leur recrutement au niveau de la plaque d'athérome et leur différenciation en cellules spumeuses, et 3) ils expriment à des niveaux significatifs des gènes cibles de LXR comme ABCA-I. Il a été montré qu'un traitement *in vivo* par des agonistes de récepteurs nucléaires (les fibrates, ligands de PPAR alpha) modifie significativement l'expression de gènes cibles des récepteurs nucléaires au niveau des monocytes circulants ².

L'étude des monocytes du sang circulant à la recherche de marqueurs précoces d'activité d'agonistes de récepteurs nucléaires est donc, à l'heure actuelle, l'approche qui semble la plus appropriée.

I.4 - Les récepteurs nucléaires : nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer.

Depuis quelques années est apparue la notion selon laquelle certains agonistes/antagonistes des récepteurs nucléaires pourraient avoir un effet cytotoxique vis à vis des cellules cancéreuses, ouvrant la porte à de nouvelles applications thérapeutiques de ces molécules. Cela concerne d'abord l'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire, mais il s'agit d'un cas très particulier puisque la physiopathologie de la maladie fait intervenir un réarrangement génique impliquant le récepteur nucléaire RAR alpha. Des mutations entraînant des pertes de fonctions des récepteurs nucléaires ont été décrites dans d'autres cancers et l'acide rétinoïque a été utilisé dans certaines tumeurs en l'absence de translocation impliquant RAR-alpha. Enfin, d'autres ligands pharmacologiques des récepteurs nucléaires, ciblant en particulier les récepteurs de type II mais également LXR, ont démontré une certaine activité différenciante ou cytotoxique, les récepteurs nucléaires étant impliqués dans les processus de différenciation et de mort cellulaire ^{3 4}.

¹ Masson D, et al. (2004) *J. Lipid Res.* 45 : 543-50.

² Forcheron F, et al. (2002) 51: 3486-91.

³ Rumi M.A et al. (2004) *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 6: 465-77

Des études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence l'action antitumorale de certains ligands via leur capacité à accélérer la différenciation des cellules cancéreuses, à freiner la prolifération cellulaire ou encore à inhiber l'angiogenèse^{5 6}. Dans des modèles animaux, ces molécules ont également démontré leur effet préventif contre l'apparition de tumeurs induites par des carcinogènes chimiques. De nombreux points restent toutefois à élucider avant d'envisager une utilisation généralisée de ces molécules en thérapeutique humaine. Ainsi, il n'est pas certain que tous les effets des molécules testées passent par les récepteurs nucléaires. En outre, les effets indésirables de certaines molécules sont un obstacle à leur utilisation puisque ils peuvent même prédisposer au développement de cancers dans certains modèles⁷.

Parmi les molécules les plus étudiées, les agonistes de PPAR gamma (récepteur activant la prolifération des peroxyosomes) pourraient avoir un intérêt dans le traitement de certains cancers comme les liposarcomes et les cancers de la prostate^{1 2}. A l'inverse, les effets tumoricides des agonistes/antagonistes de LXR sont moins documentés. Les relations entre les PPARs et LXR ainsi que la mise en évidence récente du rôle de LXR dans la différenciation cellulaire, l'apoptose et la réponse immunitaire conduisent à penser que des ligands de LXR pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans certains cancers^{3 4}.

Parmi les questions envisagées dans ce programme, il est prévu de tester les activités cytostatiques et cytotoxiques potentielles (ou chimiosensibilisantes) des agonistes / antagonistes des récepteurs nucléaires élaborés par Fournier Pharma vis à vis de cellules tumorales *in vitro* et chez l'animal, avec la collaboration d'Oncodesign SA.

I.5 - Les récepteurs nucléaires et les protéines de stress.

I.5.1 - Les relations entre protéines de stress et récepteurs nucléaires :

La constitution des complexes de transcription est une étape clef de la régulation de l'expression des gènes. La réponse aux hormones et la réponse au stress ont en commun leur caractère inductible, leur cinétique rapide et réversible et leur régulation au niveau transcriptionnel impliquant des facteurs de transcription qui passent rapidement d'un état actif à un état inactif et retour. C'est le facteur de transcription HSF1 qui est au cœur de la réponse au stress, passant d'un état inactif à un état activé (formation d'un trimère, phosphorylation, liaison à l'ADN) en quelques minutes, sous le contrôle étroit des chaperons de la famille Hsp que sont Hsp40, Hsp70 et Hsp90.

En réponse à une interaction avec leur ligand spécifique, les récepteurs intracellulaires tels que les récepteurs hormonaux s'associent à une série de protéines accessoires pour former ces complexes. Parmi ces protéines accessoires, on trouve à nouveau Hsp70, Hsp90 et des molécules co-chaperon comme BAG1⁵ et p23. Ces protéines de stress coordonnent, par l'intermédiaire des molécules co-chaperon, l'assemblage et de désassemblage des complexes de transcription.⁶

⁴ Fukuchi J. et al. (2004) *Cancer Res.* 64 : 7686-7689

⁵ Theocharis S. et al. (2004) *Cancer Treat Rev.* 30: 545-54

⁶ Margeli A, et al. (2003) *Angiogenesis.* 6:165-9.

⁷ Baek et al. (2003) *J Biol Chem.* 278: 5845-53

¹ Tontonoz P, et al. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 237-41.

² Subbarayan V et al. (2004) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13: 1710-6.

³ Seo JB, et al. (2004) *Mol Cell Biol.* 24: 3430-44.

⁴ Valledor AF et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 17813-8.

⁵ Cato AC, Mink S. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 78 : 379

⁶ Morimoto RI, *Cell* 2002, 110 ;281

Par exemple, il a été montré, par immunoprécipitation de chromatine, que les protéines p23 et Hsp90 étaient associées au récepteur des glucocorticoïdes fixé sur une séquence d'ADN spécifique (GRE). La molécule co-chaperon p23, dont l'effet est contrôlé par Hsp90, semble avoir deux effets : elle entre en compétition avec des molécules co-activatrices au niveau des complexes de transcription et constitue une étape limitante pour la dissociation de ces complexes.¹

Plus récemment, il est apparu que la protéine Hsp90 interagissait aussi directement avec les récepteurs nucléaires de la famille PPAR dont elle peut moduler la fonction. Les interactions entre protéines de stress et autres récepteurs nucléaires tels que RAR, RXR ou LXR ne sont pas encore connues.

I.5.2 – Les protéines de stress et les récepteurs nucléaires, cibles potentielles de médicaments cytotoxiques :

L'activité des complexes transcriptionnels impliquant des protéines chaperons et des récepteurs nucléaires peut jouer un rôle dans l'oncogénèse et la tumorigénèse. Pour prendre un exemple, il a été montré très récemment que la synucléine gamma, identifiée dans les cellules cancéreuses mammaires, stimulait l'activité transcriptionnelle du récepteur aux oestrogènes par son activité chaperon, interagissant avec les molécules de la famille Hsp, et que cela pourrait expliquer son effet sur la tumorigénèse.²

Les protéines de stress comme les récepteurs nucléaires sont des cibles potentielles de médicaments anticancéreux. Les molécules ciblant la protéine de stress HSP90, qu'il s'agisse de la geldanamycine ou de ses dérivés, sont des molécules cytotoxiques désormais testées dans le traitement des cancers chez l'homme.³ Un agoniste du récepteur PPAR γ (troglitazone) a démontré des effets anti-prolifératif, cytotoxique et chimiosensibilisant vis à vis de lignées de cellules tumorales d'origine pancréatique ou hépatique.⁴ L'engagement du récepteur PPAR γ peut modifier l'expression de la protéine de stress HSP70, possiblement via le stress réticulaire induit.⁵

Sur la base de ces observations encore préliminaires, il apparaît raisonnable d'émettre l'hypothèse selon laquelle le ciblage de récepteurs nucléaires par des agonistes ou des antagonistes pourrait avoir un effet cytotoxique ou moduler l'expression et/ou la fonction des protéines de stress.

¹ Freemann BC, Yamamoto KR, Science, 2002, 296 :2232

² Jiang Y et al, Cancer Res, 2004, 64 : 4539

³ Neckers L & Ivy SP, Curr Opin Oncol, 2003, 15 : 419

⁴ Yoshizawa K et al, Cancer, 2002, 95 : 2243 ; Kawa S et al, Pancreas, 2002, 24 : 1

⁵ Weber SM et al, Am J Physiol Endocrinol Metab 2004, 287 : E1171

II - Marqueurs précoces d'efficacité des agonistes LXR - Programme et méthodes

- Le programme proposé a pour objectif d'identifier, dans des monocytes circulants, des marqueurs biologiques d'activité des molécules agonistes et antagonistes des récepteurs nucléaires (principalement LXR) synthétisées par Fournier Pharma. Ces marqueurs seront des cibles de ces récepteurs, certaines étant déjà identifiées et caractérisées, d'autres pouvant être identifiées à l'occasion de ce travail.
- Les marqueurs identifiés seront alors étudiés dans des situations pathologiques telles que le diabète et les dyslipidémies afin de déterminer si ces pathologies modifient leur expression avant toute thérapeutique et si les molécules Fournier modulent leur expression de la même manière que chez le sujet sain ou corrigent d'éventuelles modifications caractéristiques de la maladie traitée.
- La dernière partie du programme sera consacrée à l'étude de l'implication physio-pathologique des marqueurs identifiés et de leur rôle potentiel dans la réponse aux molécules étudiées.

II.1. Identification des marqueurs sur des monocytes de sujets sains.

II.1.1 - Recueil et traitement des échantillons.

Des monocytes isolés du sang périphérique de sujets sains (méthode Mylteni) seront cultivés en présence de M-CSF (facteur de croissance/différentiation des monocytes). Les monocytes seront obtenus dans le cadre d'un accord avec l'Etablissement de Transfusion Sanguine de Dijon, les techniques de séparation et de culture étant déjà mises en place à l'unité INSERM U517 (une des équipes de l'IFR100). Les monocytes seront incubés pendant 0, 6, 12, 24, 48 et 96 heures avec des molécules synthétisées par Fournier Pharma à doses pharmacologiquement pertinentes.

II.1.2 - Approche ciblée par l'étude de gènes candidats.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à des gènes qui sont des cibles connues de LXR (principalement ABCA1, ABCG1 et CETP). Nous utiliserons la PCR quantitative afin de valider leur modulation par LXR dans les monocytes humains en culture *ex vivo*. Cette première partie de l'étude devrait nous permettre de confirmer l'intérêt du monocyte en tant que marqueur potentiel de la réponse aux agonistes / antagonistes de LXR, de déterminer les concentrations actives des molécules testées ainsi que les durées de stimulation optimum et, potentiellement, d'autres ligands de récepteurs nucléaires ; donc de valider le monocyte comme un modèle adéquat pour notre approche.

Cette validation s'impose avant 1) de tester l'intérêt du monocyte circulant en tant que marqueur précoce de l'activité de ces molécules administrées à l'homme dans des conditions cliniques (partie clinique) et 2) d'envisager une exploration plus globale de la réponse monocyttaire à ces molécules par l'analyse de leur influence sur le transcriptome et le protéome cellulaire (partie recherche).

II.1.3 - Approche globale par l'étude du transcriptome.

L'étude globale du transcriptome des monocytes exposés aux molécules Fournier sera conduite sur puces à ADN (type puce 44000 gènes Agilent) au sein de la plate-forme "Transcriptome" de l'Institut Gustave-Roussy à Villejuif. Il est prévu de tester 10 échantillons cellulaires pour évaluer la variabilité inter-individuelle et de tester chacun de ces échantillons après différents temps d'incubation ($n = 4$) en présence de la molécule étudiée. La séparation des monocytes, leur incubation avec la molécule testées, le recueil des cellules et la préparation des échantillons d'ARN puis d'ADNc seront effectués à Dijon.

Les variations d'expression des principaux gènes identifiés par cette approche seront ensuite confirmées par RT-PCR quantitative et validées sur 10 nouveaux échantillons. Enfin, l'étude de l'expression des protéines correspondant aux gènes identifiés sera conduite par immuno-empreinte.

II.1.4 - Approche ciblée sur l'étude des protéines de stress.

Nous nous intéresserons initialement à l'influence des molécules synthétisées par Fournier Pharma sur les protéines de choc thermique encore appelées protéines de stress (Hsps). Nous étudierons l'influence d'une exposition de durée variable des monocytes humains normaux à des doses pharmacologiquement pertinentes des molécules étudiées sur l'expression (immuno-empreintes) et la localisation subcellulaire (immunofluorescence) des petites (principalement HSP27) et grandes (HSP70 et HSP90) protéines de stress.

II.1.5 - Approche globale par l'étude du protéome cellulaire.

Nous étudierons par analyse spectrale le protéome des monocytes circulants, avant et après exposition aux molécules Fournier, avec séquençage des principaux marqueurs dont l'expression est modifiée par l'exposition à la molécule étudiée et validation par immuno-empreinte. Cette partie de l'étude sera conduite en collaboration avec la plate forme protéomique de l'IFR 100.

II.1.6 - Approche globale par l'étude du protéome sécrété.

De manière similaire, nous étudierons par analyse spectrale le protéome sécrété par les monocytes circulants, avant et après exposition aux molécules Fournier, avec séquençage des principaux marqueurs dont l'expression sera modifiée par l'exposition à la molécule étudiée et validation par immuno-empreinte. Cette partie de l'étude sera, elle aussi, conduite en collaboration avec la plate forme protéomique de l'IFR 100.

A ce stade du projet, la synthèse des données obtenues devrait permettre de sélectionner un certain nombre de marqueurs qui seront utilisés dans la suite du programme. Ces marqueurs devront répondre aux caractéristiques suivantes :

- marqueur, robuste et reproductible, signature d'activité de la molécule Fournier à étudier en clinique gène ou protéine potentiellement impliquée en physiopathologie,
- gène ou protéine potentiellement impliquée dans l'effet thérapeutique des molécules Fournier.

Les marqueurs sélectionnés seront utilisés pour les études *in vivo* (approche 1.7 ci dessous), lors de l'étude des monocytes de sujets malades (deuxième partie du projet) et dans le cadre d'études plus fondamentales visant à étudier leur implication physiopathologiques (troisième partie du projet).

II.1.7 - Etudes *in vivo*.

L'objectif final de cette première partie du programme sera de valider chez des sujets sains recevant la molécule dans le contexte d'un essai clinique de phase I sans bénéfice individuel direct les marqueurs d'activité de la molécules Fournier précédemment identifiés (Fournier et/ou Centre d'Investigation Clinique du CHU). Cette validation pourra intervenir dès finalisation de l'approche 1.1 en fonction des résultats et des opportunités cliniques définies par l'avancement des programmes Fournier. Parallèlement, une étude pilote sera conduite à partir de monocytes prélevés chez des patients dyslipidémiques recevant un traitement hypolipémiant (par exemple fibrates). Cette étude menée en collaboration avec le service d'endocrinologie du CHU de Dijon permettra d'évaluer les effets d'un traitement pharmacologique *in vivo* sur les marqueurs sélectionnés au niveau du monocyte. Les monocytes seront prélevés chez un même patient avant et après sa mise sous traitement.

II.2. Etude des monocytes de sujets malades.

II.2.1 - Recueil et traitement des échantillons.

Les monocytes seront obtenus dans le cadre notamment d'une collaboration avec le service d'endocrinologie du CHU de Dijon et dans le contexte d'un essai clinique soumis à l'approbation d'un comité d'éthique. Une attention particulière sera portée à la sélection des patients (homogénéité) et le choix des marqueurs étudiés sera en grande partie fonction des résultats de la partie 1 du programme.

II.2.2 - Réponse *in vitro* des monocytes de sujets malades (diabète ou dyslipidémie) aux molécules Fournier.

Les études effectuées sur les monocytes de sujets sains seront reprises sur des monocytes de sujets malades (diabète ou dyslipidémie) en suivant les approches de la partie 1 adaptées en fonction des résultats de cette première partie. De ce fait, des approches ciblées centrées sur les marqueurs identifiés dans la première partie du programme (après vérification de l'influence de la maladie sur leur expression basale) seront préférées aux approches globales. La recherche portera donc sur les gènes et protéines modifiés par les ligands étudiés en 1. Des altérations de certaines voies métaboliques (par exemple modification des protéines de transport membranaire des lipides) seront recherchées dans les monocytes de sujets malades avant de déterminer si les molécules développées par Fournier sont susceptibles de corriger ces altérations.

II.2.3 - Réponse *in vivo* des monocytes de sujets malades (diabète ou dyslipidémie) aux molécules Fournier.

Les marqueurs étudiés (gène, protéine) seront sélectionnés à l'issue des études précédentes avant de tester leur intérêt en tant que marqueur de la réponse aux molécules étudiées chez l'homme. En pratique, nous étudierons la réponse des monocytes *in vivo* chez les sujets malades recevant une molécule Fournier dans le cadre d'un essai clinique de phase II ou III.

II.3 - Etudes fonctionnelles et physiopathologiques des marqueurs identifiés.

Cette partie plus mécanistique complètera les approches globales des parties 1 et 2.

Il s'agira en particulier d'étudier les relations existants entre les cibles identifiées et les modifications fonctionnelles des monocytes induites par la molécule testée (par exemple corrélation entre induction d'ABCA1/ABCG1 et efflux de cholestérol sous l'effet d'un agoniste LXR).

Une attention particulière sera portée alors à la composition lipidique des monocytes et à la localisation subcellulaire de ces lipides par fractionnement et spectrométrie de masse.

Plus globalement, les objectifs de cette troisième partie sont de déterminer l'implication physiopathologique d'un ou de plusieurs marqueurs identifiés soit dans le développement de la pathologie soit dans la modulation de l'effet thérapeutique des molécules Fournier. L'un de ces marqueurs pourra être sélectionné pour initier des études complémentaires dans des modèles animaux de la pathologie étudiée. Les objectifs de cette phase seront bien évidemment modulés en fonction du temps nécessaire à l'identification des marqueurs et de la nature du marqueur sélectionné.

III - Activité cytotoxique des molécules ciblant les récepteurs nucléaires Programme et méthodes

III. 1. Objectifs généraux.

L'objectif principal de cette partie de l'étude est de déterminer si les agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires synthétisés par Fournier Pharma ont des effets cytostatiques, cytotoxiques, différenciants ou chimiosensibilisants, *in vitro* et *in vivo*, justifiant d'explorer l'utilité de ces molécules en oncologie médicale.

Si un effet des agonistes / antagonistes des récepteurs nucléaires vis à vis des cellules tumorales est observé dans les modèles étudiés, deux perspectives sont envisagées :

- 1 - Des études mécanistiques plus élaborées : relation avec l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires, avec la réponse immunitaire anti-tumorale, avec la différenciation.
- 2 - Le développement d'études cliniques en fonction des résultats des travaux de toxicologie animale.

III.2. Recherche d'effets cytostatiques ou cytotoxiques.

Ces effets seront recherchés par des tests de cytotoxicité (tests clonogéniques et tests MTT) dans des lignées tumorales humaines en culture (notamment mais pas exclusivement cellules leucémiques et de cancer colique) exposées à des doses croissantes de molécules Fournier.

Dans un second temps, ils seront explorés sur des cellules fraîches isolées de patients atteints de pathologie tumorale, en particulier de leucémie aiguë ou chronique.

Si ces tests révèlent un effet, nous rechercherons s'il s'agit d'un arrêt du cycle cellulaire, d'un effet différenciant ou de l'induction d'une mort cellulaire dont la forme sera précisée. Les mécanismes moléculaires de ces effets seront alors déterminés, en s'intéressant tout particulièrement au lien entre ces effets et les protéines de stress.

Les effets cytostatiques / cytotoxiques des molécules Fournier seront aussi testés *in vivo* chez l'animal dans des modèles de tumeurs humaines développées chez la souris SCID ou NOD-SCID puis dans des modèles syngéniques (effet sur la réponse immunitaire anti-tumorale) ou orthotopiques. Là encore, l'expression des Hsps pourra être étudiée dans les différents organes et le sang des animaux (Elisa).

Une partie de ce travail, en particulier les étapes de screening initiales et l'expérimentation animale, sera réalisée par les laboratoires Oncodesign SA.

III.3. Recherche d'effets chimiosensibilisants sur cellules tumorales humaines.

Cette activité sera explorée par des tests de cytotoxicité (tests clonogéniques, tests MTT) dans des lignées tumorales humaines en culture (cellules leucémiques et de cancer colique) exposées à des associations molécule Fournier / agent cytotoxique (cisplatine, étoposide, anthracycline notamment).

Les relations entre protéines de stress et chimiosensibilisation seront explorées, ainsi que l'effet chimiosensibilisant dans des modèles animaux similaires à ceux évoqués dans la partie III.2.

III.4 - Effet sur les protéines de stress.

Quelques que soient les applications thérapeutiques ultérieures des molécules synthétisées par les laboratoires Fournier, il sera utile de connaître l'effet de ces molécules sur l'expression et la fonction des protéines de stress de la famille Hsp, compte-tenu des relations entre ces deux familles de molécules.

Si un effet des molécules Fournier sur les protéines de stress est observé dans les monocytes primaires, les lignées tumorales offriront une opportunité pour étudier plus spécifiquement cet effet.

L'expression des protéines de la famille Hsp sera étudiée par Western-Blot et de manière cinétique dans des lignées tumorales humaines en culture (cellules leucémiques et de cancer colique) exposées à des doses croissantes de molécules Fournier. Si un effet est observé, le rôle des Hsps dans la réponse aux molécules Fournier sera exploré *in vitro* et *in vivo* grâce aux multiples modèles mis en place au cours de ces dernières années par l'équipe de C Garrido au sein de l'U517 (lignées transfectées stables avec des protéines de stress sauvages ou mutées, siRNA, peptides inhibiteurs). D'autre part, l'influence de ces molécules sur l'activité du protéasome, un déterminant essentiel de la survie de certaines cellules tumorales sous le contrôle des protéines de stress, sera examinée.

IV- Indicateurs d'évaluation

IV.1 - Marqueurs précoces d'efficacité.

Partie 1

- Valider les méthodes mises en œuvre et leur reproductibilité
- Déterminer en quoi le monocyte est une cellule intéressante en tant que marqueur d'une activité biologique des molécules étudiées chez l'homme
- Sélection de marqueurs d'intérêt potentiel
- Validation clinique

Partie 2

- Identifier l'influence de la pathologie sur le monocyte (variabilité liée à la maladie des marqueurs sélectionnés dans la partie 1)
- Valider l'intérêt des marqueurs biologiques sélectionnés dans la partie 1 sur des monocytes de sujet malade
- Validation clinique

Partie 3

- Démonstration du rôle physiopathologique de l'un des marqueurs monocytaires identifiés, en utilisant si besoin des modèles animaux de diabète ou d'athérosclérose

IV.2 - Activités anticancéreuses.

Partie 1 - Sous-traitance partielle chez Oncodesign SA (année 1)

- Mise en évidence d'une action cytostatique/cytotoxique des molécules (5 molécules sélectionnées par le département recherche des laboratoires Fournier) dans un ou plusieurs des modèles testés.
- Si un effet est identifié pour au moins une des molécules testées, nous étudierons les effets sur la progression dans le cycle cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire.
- Parallèlement, nous testerons la ou les molécules ayant démontré une efficacité dans des modèles animaux, initialement des modèles de greffe xénogénique de lignées tumorales humaines chez la souris SCID, puis, le cas échéant, dans d'autres modèles (par exemple, de cellules leucémiques fraîches chez la souris NOD/SCID).

Si un effet cytotoxique, cytostatique, différenciant ou chimiosensibilisant est identifié pour au moins une des molécules testées, les mécanismes moléculaires de cet effet seront explorés (Consultance : Carmen Garrido, DR2 Inserm) avec un intérêt particulier pour :

- Le rôle de la cible (récepteur nucléaire et leur activité transcriptionnelle) dans l'activité observée.
- Le rôle des protéines de stress dans la réponse identifiée et ses liens avec le protéasome.

V - Résultats attendus et perspectives

V.1 - Marqueurs précoces d'efficacité.

Si les effets de certains ligands des récepteurs nucléaires (par exemple PPAR alpha tel que le fénofibrate) sont bien connus sur les lipides sanguins circulants et constituent un reflet de leur activité clinique, il n'en est pas de même pour d'autres produits tels que les ligands LXRs d'où la nécessité de développer des outils (marqueurs) pouvant prédire de leur efficacité clinique.

Le travail proposé en collaboration avec Fournier Pharma devrait permettre d'identifier, au niveau du monocyte circulant d'un patient recevant une molécule ligand d'un récepteur nucléaire, un ou plusieurs marqueurs biologiques d'intérêt clinique.

Un premier objectif sera de déterminer les doses actives des produits administrés chez l'homme sur ces marqueurs. Bien que par définition, la relation entre l'activation de ce marqueurs et l'intensité de l'effet clinique recherché ne soit pas connue au départ, la connaissance des doses actives sur ce(s) marqueur(s) et de celles faisant apparaître des effets secondaires dans les études de phase I, devrait permettre de guider le développement clinique vers les doses à utiliser en phase II. Ces phases II nécessiteront des investissements lourds et cette étape de recherche clinique sera donc tout à fait cruciale pour Fournier Pharma. L'intérêt des marqueurs sélectionnés en tant que prédicteur de la réponse à long terme au traitement sera complètement validé par les études de phase II. Idéalement il sera possible en recoupant différents marqueurs, de disposer d'une méthode prédictive d'efficacité de candidats médicaments dans le traitement du diabète, des dyslipidémies et de l'athérosclérose et ce dès les premières phases du développement clinique. Ces connaissances accumulées apporteront des informations pour développer des produits de deuxième génération.

Un deuxième objectif recouvre un aspect plus fondamental ayant trait aux pathologies étudiées et qui vise à déterminer si le monocytes circulant est le reflet d'altérations fonctionnelles au niveau du macrophage qui pourraient expliquer par exemple la plus grande susceptibilité des diabétiques au développement de l'athérosclérose.

V.2 - Activité anticancéreuse.

Les ligands des récepteurs nucléaires sont connus pour agir sur de nombreuses voies métaboliques et ainsi d'avoir un insert thérapeutique potentiel pour des situations pathologiques variées. Le cancer constitue l'un de ces intérêts potentiels. Une première étape consistera en une preuve de concept chez l'animal.

Si un effet des agonistes / antagonistes des récepteurs nucléaires vis à vis des cellules tumorales est observé dans les modèles étudiés, trois perspectives sont envisagées :

- la poursuite des études mécanistiques, en particulier des relations entre l'effet observé et l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires et la réponse immunitaire anti-tumorale dans des modèles animaux syngéniques,
- la mise en place d'études cliniques preuve de concept,
- le développement de nouveaux types de médicaments. Un tel développement pourra être effectué soit par Fournier Pharma, soit sous la forme d'un partenariat qui devra être défini ultérieurement.

5.-EQUIPEMENTS

1. Mi-lourds et lourds existant dans le laboratoire
(préciser ceux utilisés pour le programme)

Les structures communes mises en place par l'IFR100 sont :

1 - La préparation à la microscopie :

Les moyens humains: Un technicien IATOSS, Franck Ménétrier, a été nommé sur un poste redéployé par l'UFR de Médecine vers l'IFR pour gérer la structure de préparation à la microscopie, principalement électronique et l'IFR100 finance actuellement sa formation. Il est assisté d'une adjointe technique (AJT). L'unité 517 met à la disposition de l'I.F.R. une technicienne INSERM, Madame Monique Moutet, pour l'immunocyto et histochimie (50%). En 2004, a été créé un poste d'ingénieur de recherche temps-plein de l'Université pour renforcer cette structure et développer l'imagerie cellulaire et moléculaire (vidéomicroscopie, transfert de fluorescence). Ce poste a été confié à André Bouchot.

Les moyens matériels : Nous disposons de 2 salles attribuées à la préparation des échantillons destinés à la microscopie électronique et d'une salle dédiée à la vidéomicroscopie. Certains équipements ont été redistribués et l'IFR100 a financé la mise en place d'une structure de microscopie à fluorescence inversée, à la demande des différentes équipes. Les subventions obtenues du ministère ont permis de financer le fonctionnement de cette structure et la formation du technicien. Les techniques classiques d'histologie et d'immunomarquage sont en place. La vidéomicroscopie également. La compétence acquise par le personnel dédié à l'IFR100 devrait permettre d'ouvrir la structure en offrant des services aux entreprises extérieures afin de contribuer au financement de l'Institut.

Les besoins financiers : Les coûts de fonctionnement de la structure de préparation à la microscopie sont estimés à 7500 Euros par an (petit matériel, réactifs communs et vacations SERCOBIO) auxquels il faut ajouter des coûts de formation à de nouvelles techniques (Environ 1500 Euros par an).

2 - La mesure des espèces radicalaires :

Les moyens humains : Catherine Vergely, maître de conférences en Physiopathologie à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques, est spécialisée en Résonance Paramagnétique Electronique et spin trapping. Elle assure la coordination technique du projet utilisant la RPE et de participer à la mise au point de la technique de spin trapping - MRI.

Les moyens matériels : Le laboratoire LPPCE (EA2979) met à la disposition de l'IFR un appareil de spectroscopie RPE ESP-300 E bande X, muni de cavités TM et DR, permettant l'identification et la quantification de différentes espèces radicalaires. Les différents spin-trap utilisés permettent de mesurer les radicaux libres oxygénés ou le monoxyde d'azote, aussi bien sur les tissus congelés que dans les milieux biologiques. Cet équipement a été optimisé en 2004 grâce au soutien du Contrat de Plan Etat Région.

Les besoins financiers : Il s'agit des coûts de fonctionnement et d'entretien de l'appareil de RPE (Dewar, 3 cellules en quartz : 5000 Euros) et de l'achat de nouveaux spin-traps (3000 Euros) soit un total de 8000 Euros par an

3 - La biologie Moléculaire : PCR quantitative

Les moyens humains : Madame Sarab Lizard (Ingénieur de Recherche, Unité 517 et Centre de Lutte Contre le Cancer) est en charge du fonctionnement et du développement de cette technique appliquée notamment aux projets d'épidémiologie moléculaire.

Les moyens matériels : L'appareil Taqman est installé depuis le début mars 2000 et fonctionne quotidiennement.

Les besoins financiers : Les coûts de fonctionnement, qui augmentent progressivement, correspondent aux réactifs communs, les amorces spécifiques étant à la charge des équipes utilisant l'appareil. Par exemple, les réactifs de fluorescence représentent 450 Euros pour 200 PCR, soit environ 4500 Euros par an. L'entretien de l'équipement est évalué à 4000 Euros par an. Un renouvellement est à envisager dans un à 2 ans pour l'étude d'échantillons en série.

4 - La spectrométrie de masse des lipides

Les moyens humains : Une assistante ingénieur (Anne Athias) assure le fonctionnement de la spectrométrie de masse.

Les moyens matériels : Nous disposons d'un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett-Packard 6890) couplé à un spectromètre de masse fonctionnant sur le mode impact électronique et ionisation chimique (Hewlett-Packard 5973), d'une chaîne HPLC (Hewlett-Packard 1100) couplée à un spectromètre de masse (simple quadropôle) fonctionnant sur le mode électrospray et ionisation chimique à pression atmosphérique (Hewlett-Packard 1100 MSD) et d'une électrophorèse capillaire (Hewlett-Packard) couplée au spectromètre de masse de la chaîne HPLC.

Les besoins financiers : Le fonctionnement commun représente environ 5000 Euros par an.

5 - La protéomique

Les moyens humains : Dans le cadre du plan cancérpôle, deux postes d'ingénieurs de recherche (protéomique et bio-informatique) sont financés à partir de janvier 2005 (Région + COMADI + ARH + UB). En outre, la plate-forme bénéficie de la participation d'un Ingénieur d'Etudes de l'unité 498, Jean-Paul Pays de Barros, et de l'aide d'Ali Bettaiëb (Directeur de recherche à l'EPHE, U517).

Les moyens matériels : Nous avons acquis successivement une chaîne de chromatographie de filtration sur gel Amersham (première année de financement de l'IFR100 – 2001) puis un équipement d'électrophorèse bidimensionnelle BioRad (seconde année – 2002) puis un appareil de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse appliquée à la protéomique (Brucker) installé en décembre 2004.

Les besoins financiers : Le fonctionnement représentera environ 100 000 Euros en 2005 avec le développement des projets cliniques financés par le plan Cancer et le PHRC.

6 - La cytométrie en flux

Les moyens humains : Un Ingénieur de Recherche, Annabelle Legrand, a été recrutée par l'Université pour gérer le centre. Gérard Lizard, CR1 INSERM (U498) ayant une expérience importante en cytométrie, coordonne les activités. L'INSERM U517 détache à mi-temps Madame Arlette Hammann, AI INSERM, sur cette activité.

Les moyens matériels : Nous venons d'obtenir la réorganisation du Centre de Cytométrie de l'Université de Bourgogne qui sera désormais géré par l'IFR100. Ce centre utilisait un cytomètre trieur Coulter. A cette occasion :

- Des locaux ont été spécifiquement aménagés au troisième étage de l'UFR médecine
- Nous avons acquis en 2003 un cytomètre 6 couleurs (INSERM + Région + ARC)
- Nous associons aux deux appareils précédents deux appareils plus anciens des équipes de l'IFR pour les travaux de routine.

Cela représente donc 4 cytomètres et deux personnes dédiées à la gestion du centre.

Les besoins financiers : Le fonctionnement autonome du centre de cytométrie a été assuré en 2004, grâce à la participation demandée aux utilisateurs, à des sessions de formation et à des contrats extérieurs (Oncodesign).

Des équipements spécifiques seront achetés au cours du programme :

L'utilisation d'appareils PCR en temps réel est maintenant indispensable pour étudier l'expression des gènes de manière fiable et rapide. Il faut par ailleurs noter que les articles incluant des quantifications d'ARN messagers par RT-PCR classique ne sont plus acceptés par les revues scientifiques de niveau international. Pour cette raison, l'acquisition d'appareils d'analyse PCR en temps réel est indispensable à la bonne réalisation de ce programme.

1 - Un équipement analyse PCR en temps réel rapide

Cette machine type "Light cycler" permettra l'obtention de résultats extrêmement rapidement (environ 30 minutes) avec un nombre d'échantillons pouvant aller jusqu'à 32, ce qui permet une utilisation très flexible de la machine.

2 - Un équipement analyse PCR en temps réel haut débit

Cet appareil fonctionnera avec des microplaques 96 puits, ce qui assurera un haut débit d'analyse.

**6.-COMPOSITION DE L'EQUIPE PARTICIPANT AU PROGRAMME
(chercheurs, ingénieurs, techniciens, doctorants et post-doctorants)**

Nom-prénom-âge	Titre ou grade	Appartenance administrative	Formation Compétence	% du temps ouvrable consacré au programme de recherche présenté
David Masson (35 ans)	MCU-PH	Université de bourgogne	Ph. D. Pharm. D.	40 %
Eric Solary*	PU-PH	Université de bourgogne	Ph.D. M.D.	15 %
Philippe Gambert* (54 ans)	PU-PH	Université de bourgogne	Ph. D. M.D.	15 %
A recruter	1 chercheur postdoctorant	BT	Ph. D.	100 %
A recruter	1 technicien	BT	BTS	100 %
A recruter	bourse CIFRE	BT	Thésard	100 %
Gilles Sauvage (50 ans)	Consultant	BT	Dr Pharm.	3 %

TOTAL EQUIVALENTS-CERCHEURS TEMPS-PLEIN :

NB : signaler par (*) les chercheurs titulaires d'une HDR

7.-CALENDRIER D'EXECUTION DU PROGRAMME

Année 1

Marqueurs précoces d'efficacité :

Mois 1 à 3

- Mise en place des procédures de recueil des monocytes et de préparation des échantillons en vue des approches ciblées, et globales transcriptomiques et protéomiques.
- Validation du modèle par étude ciblée de la réponse de gènes cibles sélectionnés de LXR aux molécules Fournier à partir de monocytes prélevés chez des sujets sains et chez des patients dyslipidémiques/diabétiques. Etude par PCR quantitative et approches immunologiques (*Partie II. 1.2. du programme*).

Mois 4 à 12

- Etude globale du transcriptome des monocytes de sujets sains et de patients dyslipidémiques/diabétiques traités par les molécules Fournier par puce ADN et analyse des données (*Partie II.1.3.*).
- Début de l'analyse du protéome (*Partie II.1.4. à II.1.6*)
- Préparation administrative des études *in vivo*, collaboration avec Fournier sur des études cliniques portant sur le fénofibrate (*Parties II.1.7 et II.2.3.*)
- Mise au point d'un test fonctionnel d'efflux de cholestérol sur des monocytes transformés (II.3)

Activité anticancéreuse

Mois 1 à 12

Sous traitance Oncodesign SA – recherche d'un effet anticancéreux de 5/6 molécules sélectionnées, *in vitro* sur des lignées cancéreuses en culture puis *in vivo* sur des modèles de xénogreffe ou de métastases
Début des études mécanistiques sur la base des résultats *in vitro*

Année 2

Marqueurs précoces d'efficacité :

Mois 1-6

- Fin de l'analyse du protéome (*Partie II. 1.4.à II.1.6*).
- Validation par PCR quantitative et immunoanalyse des cibles identifiées par approche globale et sélection des marqueurs utilisés pour les études ultérieures (*fin des approches in vitro sur le monocyte de sujets sains*).
- Début de l'analyse du transcriptome/protéome de monocytes de sujets dyslipidémiques/diabétiques traités *in vitro* par les molécules Fournier (*Approche II.2.2*).
- Début étude test fonctionnel d'efflux de cholestérol sur des monocytes transformés provenant de sujets sains ou pathologiques (II.3)

Mois 6-12

- Etude pilote *in vivo* de l'évolution des marqueurs identifiés chez des patients traités par hypolipémiants (par exemple fibrates) et début des études de phase I des molécules Fournier chez le volontaire sain. (*Approche II.1.7.*)
- Fin des approches globales *in vitro* chez les sujets dyslipidémiques et sélection éventuelle de nouveaux marqueurs (*Fin approche II.2.2*).

- Début des études fonctionnelles des gènes/protéines précédemment identifiés (II.3)
- Suite comparaison efflux de cholestérol sujets normaux et pathologiques (diabète, métabolique syndrome)

Activité anticancéreuse

Mois 1 à 12

- Etude mécanistique des effets anticancéreux de la ou des molécules ayant démontré un effet anticancéreux
- Poursuite d'études en collaboration avec Oncodesign (recherche de doses effets , recherche de synergie avec d'autres molécules anticancéreuses etc..)

Année 3

Marqueurs précoces d'efficacité :

- Poursuite des études fonctionnelles sur les gènes/protéines sélectionnées, efflux de cholestérol (*Partie II.3*).
- Fin de l'étude de phase I et validation *in vivo* des marqueurs sélectionnés (*Partie II.1.7*).
- Sélection des marqueurs utilisables lors des études de phase II et préparation de l'étude phase II chez de sujets dyslipidémiques/diabétiques (*Partie II.2.3*).

Activité anticancéreuse :

Mois 1 à 12

- Etudes mécanistiques et précliniques des effets anticancéreux de la ou des molécules ayant démontré un effet anticancéreux
- Préparation d'une étude clinique Phase II de preuve de concept

Suivi de la collaboration :

- Recrutement des chercheurs : consultation Fournier sur les candidats
- Informations financières sur le projet et les équipes impliquées
- Comité de pilotage : Mise en place d'un comité de pilotage mixte Fournier et IFR 100 : membres à nommer ultérieurement avec pour objectifs revu des résultats et discussion des études pour les 3/6 mois à venir. Fréquence 2/3 par an
- Rapport trimestriel d'avancement : rapport résumant les objectifs de la période écoulée, les résultats et les études en cours ou à débiter
- Contacts et réunion entre chercheurs Fournier et IFR 100

8.-PLAN DE FINANCEMENT (TOTALITE DE L'OPERATION)

(en €)

DEPENSES PAR POSTE (HT)		FINANCEMENT (HT)	
-Salaires		- Cofinancements (1)	
		- Subventions demandées	
1 bourse CIFRE (3 ans)	100 800 euros		
1 chercheur post doctorant (2 ans)	130 000 euros		
1 technicien (2 ans)	80 000 euros	Conseil Régional de Bourgogne	192 032 euros
		Conseil Général de Côte d'Or	192 031 euros
- Gros équipements :	80 000 euros	COMADI	192 032 euros
Appareils de PCR en temps réel		ANRT	43 905 euros
- Fonctionnement :	100 000 euros		
-Analyse protéomique			
-Isolement et Culture des monocytes (kits d'isolement, milieux et flacon de culture, facteurs de croissance...)			
-Préparation des échantillons d'acides nucléiques/protéine/ lipides (kits d'extractions...)			
-Réactifs PCR quantitative (kits sybr. Green)			
-Analyses immunologiques (anticorps, réactifs de révélation)			
-Produits chimiques			
- Sous-traitance confiée à des tiers (2)			
Modèles animaux en cancérologie Oncodesign SA, Dijon	90 000 euros		
Frais de gestion Bourgogne Technologies	39 200 euros		
TOTAL HT en €	620 000	TOTAL HT en €	620 000

8.-PLAN DE FINANCEMENT (TOTALITE DE L'OPERATION)

(en €)

DEPENSES PAR POSTE (TTC)		FINANCEMENT (TTC)	
-Salaires		- Cofinancements (1)	
1 bourse CIFRE (3 ans)	120 560 euros	- Subventions demandées	
1 chercheur post doctorant (2 ans)	155 480 euros		
1 technicien (2 ans)	95 680 euros	Conseil Régional de Bourgogne	230 000 euros
		Conseil Général de Côte d'Or	230 000 euros
- Gros équipements :	95 680 euros	COMADI	230 000 euros
Appareils de PCR en temps réel		ANRT	51 520 euros
- Fonctionnement :	119 600 euros		
-Analyse protéomique			
-Isolement et Culture des monocytes (kits d'isolement, milieux et flacon de culture, facteurs de croissance...)			
-Préparation des échantillons d'acides nucléiques/protéine/ lipides (kits d'extractions....)			
-Réactifs PCR quantitative (kits sybr. Green)			
-Analyses immunologiques (anticorps, réactifs de révélation)			
-Produits chimiques			
- Sous-traitance confiée à des tiers (2)			
Modèles animaux en cancérologie Oncodesign SA, Dijon	107 640 euros		
Frais de gestion Bourgogne Technologies	46 880 euros		
TOTAL TTC en €	741 520	TOTAL TTC en €	741 520

**9.- FICHE DE RENSEIGNEMENTS SUR LE PARTENAIRE ECONOMIQUE
PARTICIPANT AU PROGRAMME DE RECHERCHE**

(à joindre obligatoirement au dossier de demande de financement)

NOM ou RAISON SOCIALE :

ADRESSE DU SIEGE SOCIAL :
(et des établissements)

TEL :

ACTIVITE PRINCIPALE :

DATE DE CREATION DE L'ENTREPRISE :

FORME JURIDIQUE ACTUELLE :

EFFECTIFS :

CODE APE :

N° SIRET :

CAPITAL SOCIAL ACTUEL :

C.A. DU DERNIER EXERCICE (19...):

RESPONSABLES DIRIGEANTS :

M.	FONCTION :	TEL :
M.	FONCTION :	TEL :

NB : joindre le dernier bilan connu

**10.- LISTE DE TOUTES LES AUTRES DEMANDES PRESENTEES AU CONSEIL REGIONAL
ET ORDRE DE PRIORITE DE TOUTES LES DEMANDES**

(Y COMPRIS CELLE-CI)

(équipements, contrats d'études, allocations, promotion de la recherche)

**11.- DEMANDES D'AIDES DEPOSEES OU OBTENUES RECEMMENT
AUPRES D'AUTRES INSTANCES (UE, Ministères...)**

12.-LISTE DES EXPERTS

L'expertise du projet est réalisée sur la base d'une grille d'analyse disponible sur le site du Conseil régional de Bourgogne : www.cr-bourgogne.fr/guichet/aides. Le demandeur pourra proposer une liste de 5 personnalités scientifiques francophones, extérieures à la Région de Bourgogne, compétentes dans le domaine du projet présenté, qui pourront être saisies (mais non obligatoirement) pour l'évaluation du projet.

Il conviendra de veiller à ne proposer que des experts avec lesquels le demandeur n'entretient aucune relation de dépendance (collaboration, publication, dépendance hiérarchique, dépendance financière) afin d'éviter d'introduire un biais dans les jugements émis.

NOM – PREMOM	FONCTION-GRADE	ADRESSE (+ tél + mail + fax)	DOMAINE DE COMPETENCE
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			

RECHERCHE

TRANSFERT DE TECHNOLOGIE (1)

Titre du projet : Développement pré-clinique de ligands des récepteurs nucléaires.

Durée : 3 ans

Responsable du projet : David MASSON

IFR100 / Inserm U498 – Faculté de Médecine – 7, Bd Jeanne d'Arc – BP 87900 – 21079 Dijon Cedex

Tél : 03 80 39 32 63 Fax : 03 89 39 34 47 E-mail : david.masson@chu-dijon.fr

Intitulé et adresse du laboratoire demandeur : BOURGOGNE TECHNOLOGIES

Parc Technologique – 8 avenue Jean Bertin

BP 66517 – 21065 Dijon Cedex

Tél : 03 80 73 57 11 Fax : 03 80 74 81 96 E-mail : courrier@btechno.com

Nom du directeur du laboratoire demandeur : Jean-Paul LEQUIN, Président

Visa du directeur :

Laboratoires ou partenaires associés au projet

- IFR 100 « Athérome / Cancer » Université de Bourgogne (Pr. E. SOLARY, Pr. P. GAMBERT)
- Service d'Endocrinologie – CHU/Faculté de Médecine – Dijon (Pr. J.M. BRUN, Pr. Br. VERGES)
- Pôle de Recherche clinique – CHU de Dijon (Pr. J.P. DIDIER)
- Laboratoires Fournier – 42 rue de Longvic – 21300 Chenôve
Tél : 03 80 44 70 00 Fax : 03 80 44 70 06
- Institut Gustave Roussy ("Transcriptome") – 39 rue Camille Desmoulins – 94805 Villejuif Cedex
Tél : 01 42 11 42 11 Fax : 01 42 11 53 00
- Oncodesign SA – 20 rue Jean Mazen – BP 27627 – 21076 Dijon Cedex
Tél : 03 80 78 82 60 Fax : 03 80 78 82 61

Résumé du projet (10 lignes maximum)

Développement pré-clinique de ligands des récepteurs nucléaires : Le programme proposé a deux objectifs principaux : 1) Identifier dans des monocytes circulants humains des marqueurs biologiques précoces d'activité d'agonistes LXR développés par Fournier Pharma. 2) Déterminer si certaines de ces molécules (et d'autres ligands des récepteurs nucléaires) peuvent avoir un intérêt en cancérologie, en tant qu'agent cytotoxique, cytostatique, différenciant ou chimiosensibilisant. Les objectifs secondaires sont d'identifier de nouvelles cibles de LXR au niveau du monocyte et de nouveaux marqueurs pouvant contribuer à l'effet bénéfique des molécules Fournier. Nous chercherons à déterminer si les marqueurs biologiques identifiés sont affectés dans des situations pathologiques telles que le diabète et les dyslipidémies. L'objectif sera ensuite de vérifier si les ligands développés par Fournier exercent dans ces situations une action corrective. Enfin, l'implication des marqueurs identifiés dans le développement de la pathologie et/ou dans la modulation de l'activité des molécules Fournier sera étudiée de manière plus approfondie, avec un intérêt particulier pour les protéines de stress.

Mots-clés : Récepteurs nucléaires-Monocytes, Maladies cardiovasculaires, Cancer, Protéines de stress

Nombre de chercheurs "équivalent temps-plein" participant au projet (statutaires/non statutaires) : 5 ETP

Coût total du projet : 741 520 € T.T.C.

Subvention demandée : 230 000 € T.T.C.

Cofinancements : montant : 230 000€ T.T.C. Conseil Général Côte d'Or et Conseil Régional ; 43 905 € T.T.C. ANRT

Publications scientifiques

Nombre de publications indexées dans "Current Contents" (3 dernières années) > 100

5 publications significatives sur les trois dernières années :

- RAVAGNAN L, GURBUXANI S, SUSIN SA, MAISSE C, DAUGAS E, ZAMZAMI N, MAK T, JAATTELA M, PENNINGER JM, KROEMER G, GARRIDO C. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:839-43

- GAUTIER T, MASSON D, JONG MC, DUVERNEUIL L, LE GUERN N, DECKERT V, PAIS DE BARROS JP, DUMONT L, BATAILLE A, ZAK Z, JIANG XC, TALL AR, HAVEKES LM, LAGROST L. Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice. *J Biol Chem.* 2002;277:31354-63.

- DUCOROY P, MICHEAU O, PERRUICHE S, DUBREZ-DALLOZ L, DE FORNEL D, DUTARTRE P, SAAS P, SOLARY E. LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood.* 2003;101:194-201

- ZAHM JM, BACONNAIS S, MONIER S, BONNET N, BESSEDE G, GAMBERT P, PUCHELLE E, LIZARD G. Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. *Cytometry*, 2003, 52A: 57-69.

- PARCELLIER A, SCHMITT E, GURBUXANI S, SEIGNEURIN-BERNY D, PANCE A, CHANTOME A, PLENCHETTE S, KHOCHBIN S, SOLARY E, GARRIDO C. HSP27 is an ubiquitin-binding protein involved in I-kBa proteosomal degradation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 : 5790-802

(1) cocher la case - (2) rayer les mentions inutiles