



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (19)

1901- Compte tenu de la prévalence et de l'incidence de l'obésité et de son cortège de désordres physiopathologiques associés, de nombreuses recherches sont menées afin d'identifier de nouvelles substances capables de contrôler et de limiter la prise de poids et/ou la survenue des désordres associés. Parmi ces substances, la littérature accumulée ces dernières années sur les propriétés de composés/extraits végétaux laisse penser que ces substances pourraient présenter des effets d'intérêt vis-à-vis de l'obésité induite par l'alimentation ainsi que l'inflammation à bas bruit associée à l'obésité et l'insulino-résistance.

Notre plateforme propose à ses partenaires industriels une approche permettant de tester l'effet potentiellement bénéfique de leurs produits en administrant quotidiennement à des souris mâles C57Bl/6j pendant 5 jours la substance à tester par gavage, puis à collecter le sérum ainsi enrichi des souris pour réaliser des tests in vitro sur un modèle d'adipocyte murin (en remplacement du sérum de veau foetal présent dans le milieu de culture). Cette façon de procéder permet de prendre en compte la biodisponibilité (c'est-à-dire la fraction absorbée et métabolisée circulante) et de travailler à des concentrations physiologiques.

1902- Des études pilotes seront menées sur un petit nombre d'animaux (n=4) pour chaque nouveau composé/extrait afin de s'assurer que la dose administrée permet l'apparition de formes circulantes. Pour l'étude principale, au maximum quatre groupes de 12 animaux seront utilisés, incluant un groupe contrôle qui recevra le véhicule de solubilisation du composé/extrait (soit 3 formulations + 1 contrôle). Ce nombre d'animaux est nécessaire afin de collecter un volume suffisant de sérum pour réaliser les expériences in vitro.

Hormis le gavage quotidien, aucun stress n'est attendu pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 4 individus, et l'environnement sera enrichi par l'ajout d'un igloo en plastique et la présence de nid végétal.

Il a été estimé que nous pourrions gérer au maximum 3 études de ce type par an pendant 5 ans, le nombre maximal d'animaux utilisé au cours de cette période sera donc de 900 animaux.

1903- Améliorer l'efficacité d'utilisation des ressources alimentaires est un pilier essentiel pour assurer la durabilité des systèmes d'élevage des animaux monogastriques. Dans ce cadre, réduire la teneur en phosphore dans l'aliment représente un enjeu majeur en assurant une réduction des coûts alimentaires et des rejets. Cet objectif ne doit pas venir s'opposer au maintien d'un bon niveau de minéralisation du squelette ainsi que d'une croissance optimale de l'animal.

Il est important de trouver des stratégies nutritionnelles améliorant l'efficacité d'utilisation du phosphore. Parmi ces stratégies, il est intéressant de contrôler la balance phosphocalcique. Certains auteurs ont montré qu'il était possible de diminuer les apports en phosphore en parallèle d'une diminution des apports en calcium, sans modifier les performances de croissance des poulets. Toutefois, ces minéraux étant les constituants principaux de l'os, ces régimes pouvaient être à l'origine d'une dégradation du statut minéral osseux. D'autre part, des travaux ont montré que des poulets préalablement restreints en phosphore et calcium étaient ensuite capables d'améliorer significativement l'efficacité d'utilisation de phosphore.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier l'impact de stratégies alimentaires qui permettent de concilier performances de croissance et qualité du squelette.

Pour répondre au principe de remplacement, il est à noter que l'utilisation digestive et métabolique du phosphore et du calcium chez le poulet de chair fait intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle in silico ou in vitro pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données sur l'absorption des différents segments du tube digestif. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

L'expérimentation comportera cinq phases : le prédémarrage (J0-4), le démarrage (J4-8), la croissance (J8-18), la finition (J18-28) et le retrait (J28-35). Les aliments seront formulés aux recommandations hormis pour les teneurs en phosphore non-phytique et en calcium. Sur chaque phase, les animaux recevront l'aliment aux recommandations en phosphore et en calcium

appelé « Contrôle » ou l'aliment avec des teneurs en ces minéraux inférieurs à l'aliment « Contrôle », appelé « Bas». Ces teneurs inférieures en phosphore et en calcium dans l'aliment ont été testés précédemment et n'ont pas entraîné d'effets négatifs sur le bien-être des animaux. La combinaison des régimes « Contrôle » et « Bas» sur les différentes phases permettra la construction de 6 itinéraires alimentaires de J0 à J35. Chaque animal se verra attribué l'un des 6 itinéraires alimentaires étudiés.

Pour répondre au principe de réduction, 12 animaux à la fin de chaque phase par itinéraire seront soumis à la procédure expérimentale : une prise de sang avant abattage. Un total de 264 animaux sera soumis à cette procédure expérimentale sur l'ensemble de l'expérimentation. Le nombre d'animaux a été réduit à son minimum permettant néanmoins de montrer une différence significative entre itinéraires et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère de phosphore plasmatique. Une puissance de 90% a été choisie de façon à faire ressortir une différence même minime témoignant d'une dégradation du statut minéral de l'animal.

Pour respecter le principe de raffinement et limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, plusieurs mesures seront mises en place. Les poussins seront hébergés au sol en parquets à une densité très inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer une plateforme. Ils seront visités une fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

1904- Toutes les espèces, des bactéries à l'homme, sont soumises aux variations journalières et saisonnières de l'environnement. L'intégration par l'organisme des variations journalières telles que l'intensité lumineuse est à l'origine de l'expression de rythmes biologiques d'une période proche de 24 heures (rythmes circadiens). Ces rythmes biologiques sont générés de façon endogène par une horloge centrale, localisée dans le cerveau et qui permet aux êtres vivants d'anticiper les changements environnementaux journaliers.

Le fonctionnement autonome de cette horloge centrale repose sur l'expression de gènes appelés "gènes de l'horloge". L'activité de l'horloge centrale est synchronisée par la lumière environnementale par l'intermédiaire de la rétine et contrôle de nombreuses fonctions rythmiques (sécrétions hormonales, activité locomotrice, température, vigilance et le cycle veille/sommeil). En plus de son rôle synchronisateur de l'horloge centrale, la rétine contient également une horloge.

De nombreuses pathologies rétinienne induisent une perte partielle de la vision. Ces pathologies sont caractérisées par la dégénérescence des photorécepteurs qui altèrent donc la vision mais conduisent également à une atteinte partielle ou totale de l'information lumineuse (les aveugles en représentant le cas extrême). Nous évaluerons les conséquences de l'absence spécifique d'un type de photorécepteurs sur le fonctionnement des horloges et leur réponse à la lumière en utilisant des modèles murins transgéniques, déficients en photorécepteurs. L'altération de la réception de l'information lumineuse chez ces modèles devrait conduire à des dysfonctionnements de nombreuses fonctions physiologiques des horloges de la rétine et centrale. Si cette hypothèse se vérifie, la prise en charge de patients présentant des pathologie oculaires ne devrait donc plus se limiter à la prévention des déficits visuels mais devrait également tenir compte de l'impact potentiel sur le fonctionnement des horloges circadiennes.

Nos projets de recherche visent donc à :

- 1) Analyser les mécanismes moléculaires et physiologiques assurant la régulation par la lumière des rythmes circadiens et d'évaluer leurs altérations lors du développement de maladies neurodégénératives rétinienne chez le modèle rongeur.
 - 2) Identifier les structures photosensibles de la rétine (photorécepteurs) responsables de la régulation par la lumière des rythmes circadiens chez des modèles de souris déficientes en photorécepteurs chez l'adulte et au cours du développement.
- L'utilisation de l'animal est incontournable pour 1) pouvoir disséquer in vitro et ex vivo les processus moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la régulation par la lumière des rythmes circadiens et 2) d'accéder in vivo à la physiologie de l'organisme par une approche intégrée (comportement, reflexe pupillaire).

Démarches visant à satisfaire la règle des 3R

Remplacement :

Des approches in vitro et in vivo sont déjà réalisées au laboratoire. Cependant, l'analyse ex vivo reste incontournable, afin de mener à bien nos projets de recherche, dans un environnement physiologique.

Réduction :

Pour réduire le nombre total d'animaux :

- Nous utilisons des approches non invasives (imagerie in vivo, comportement, mesure du reflexe pupillaire) ne conduisant pas à l'euthanasie de l'animal.
- Les animaux utilisés lors des approches non-invasives pourront être utilisés ensuite dans le cadre d'une procédure ex vivo.
- Nous réalisons plusieurs prélèvements chez le même animal.

Raffinement :

Nous pratiquons un raffinement continu des pratiques d'expérimentation. Les souris sont hébergées dans des cages en présence de litière favorisant l'absorption des liquides vers le bas (la litière reste saine plus longtemps). Les souris ont également à leurs dispositions des formes d'enrichissement (nid végétal à base de fibres courtes de coton et igloo) afin de réduire le stress.

Nombre total d'animaux utilisés pour ces projets : 510

souris sauvages : 180

souris Opn4^{-/-}: 90

souris Trb-/- : 90
souris Per2:Luc : 100
souris Rev-erb:Luc : 50

1905- Avec plus de 382 millions de malades dans le monde à l'heure actuelle, le diabète est un réel problème de santé publique. La diminution de la masse fonctionnelle des cellules bêta pancréatiques (MCB) qui produisent l'insuline est une caractéristique commune aux diabètes de type 1 et de type 2. Pouvoir estimer cette MCB in vivo, de manière non invasive, permettrait aux cliniciens d'évaluer l'état du pancréas du patient et ainsi d'orienter son traitement. De plus, un tel outil pourrait permettre le suivi d'une greffe d'îlots, traitement de plus en plus envisagé dans les cas de diabète de type 1.

Des tests métaboliques, reposant sur des mesures de glycémie et d'insulinémie avec ou sans stimulation, ont été développés pour tenter d'évaluer la fonctionnalité des cellules bêta pancréatiques. Ces tests sont cependant soit très fastidieux à mettre en place soit peu sensibles. Il est par conséquent important de développer une nouvelle méthode permettant une mesure non invasive et fiable de la MCB.

L'imagerie est à priori le meilleur moyen de mesurer la MCB in vivo ; cependant, elle est relativement compliquée compte tenu du fait que les cellules bêta représentent seulement 1 à 2% de la masse totale du pancréas. De nombreux outils sont en cours de développement pour l'IRM, l'imagerie optique et l'imagerie nucléaire, mais aucun à ce jour ne s'est révélé concluant.

Le transporteur du zinc ZnT8 exprimé spécifiquement par les cellules β pancréatiques au niveau de la membrane des vésicules contenant l'insuline, est une cible potentiellement intéressante pour l'imagerie fonctionnelle de la MCB. Le transporteur ZnT8, impliqué dans la synthèse, le stockage et la régulation de la sécrétion de l'insuline, permet un efflux de zinc du cytoplasme vers les vésicules contenant l'insuline.

L'objectif majeur de ce projet est le développement d'un marqueur des cellules bêta pancréatiques ciblant ZnT8 pour l'imagerie nucléaire.

Une sélection in vitro de molécules ciblant ZnT8 sera effectuée dans un premier temps afin de ne conserver que les plus prometteuses. La séquence peptidique de la cible choisie ne diffère que d'un acide aminé entre la souris et l'homme. Le screening des molécules sera réalisé in vitro sur la cible humaine et la cible murine avec pour objectif de sélectionner des marqueurs ayant une bonne affinité pour les deux. La biodistribution des traceurs retenus, leur passage à travers l'endothélium vasculaire et la reconnaissance spécifique des cellules bêta pancréatiques in vivo ne peuvent être évalués que par imagerie de l'organe dans un organisme vivant (qui devra être confirmé par les études de la biodistribution des molécules par prélèvement des organes après euthanasie des animaux) ainsi que par l'examen du pancréas (coupes de tissus).

Tout au long des études in vivo, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limiterons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal, comme l'imagerie et les biodistributions (Remplacer). De plus, après la sélection in vitro sur cellules, nous ne choisirons parmi les traceurs les plus prometteurs que quatre d'entre eux pour les études in vivo chez la souris (Réduire).

Les molécules sélectionnées seront évaluées chez des souris KO pour ZnT8 et des souris contrôles. Au total 48 souris seront utilisées pour cette étude. Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de contrôler leur bien-être.

Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections selon les bonnes pratiques vétérinaires.

Les sessions d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), supplémentée par un mélange Air - O₂. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire (Raffiner). De plus, des points limites adaptés seront utilisées pour limiter la douleur, souffrance ou angoisse légère induite par ces procédures expérimentales.

1906- L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique qui touche surtout les personnes âgées. En France, environ 200.000 hospitalisations et 22.000 décès par an ont pour cause initiale l'insuffisance cardiaque (4,1% de l'ensemble des décès). La prise en charge de cette maladie passe par des médicaments, des actes non médicamenteux (défibrillation cardiaque, ...) et parfois de la chirurgie (remplacement de valve, transplantation cardiaque).

Parmi les actes non médicamenteux, la stimulation du nerf vague semble particulièrement prometteuse. En effet, lors de l'insuffisance cardiaque, un déséquilibre du système neurovégétatif a été mis en évidence : il se caractérise par la prédominance de l'activité sympathique. La stimulation du nerf vague permettrait un rééquilibrage de ce système, dont les principaux effets attendus sont le ralentissement de la fréquence cardiaque, une réduction de la mortalité subite et cardiovasculaire.

Sept jours après l'induction d'une insuffisance cardiaque validée par échographie. Les rats ayant atteint un stade d'insuffisance déterminée, seront équipés d'un système de stimulation du nerf vague : un groupe (n=10) recevra une stimulation chronique du nerf vague, l'autre groupe (n=10) ne recevra pas de stimulation. En parallèle, des rats non-insuffisants cardiaques (n=10) seront également équipés d'un système de stimulation du nerf vague, mais ne recevront pas de stimulation (groupe témoin) ; pour un nombre total de 30 rats. Le suivi de l'insuffisance cardiaque par échographie et de la survie des rats sera fait sur 20 semaines.

Dans le respect de la règle des 3R :

- Réduction : le nombre de rats inclus dans ce projet sera réduit au minimum tout en permettant une approche statistique pertinente.

- Remplacement : Il n'existe pas de technique de remplacement à cette étude, en raison des interactions complexes des mécanismes physiologiques.

- Raffinement : Toutes les procédures seront réalisées par du personnel formé et compétent aux techniques expérimentales. En raison d'interventions chirurgicales, l'évaluation et la prise en charge de la douleur seront particulièrement surveillées

1907- Les nouveau-nés, dont le système immunitaire est immature, sont fréquemment soumis à des infections d'origine parasitaire, virale ou bactérienne. Chez les espèces animales de rentes (ruminants, porcins, volaille, etc...), ces infections sont responsables d'une diminution de leur prise de poids mais également de nombreuses mortalités dans les élevages générant des pertes économiques fortes pour les éleveurs.

Notre laboratoire dispose d'un immunostimulant néonatal innovant capable de stimuler rapidement et de manière aspécifique, le système immunitaire des animaux nouveau-nés et de protéger ces nouveau-nés contre des maladies infectieuses. L'efficacité de cet immunostimulant néonatal a notamment été démontrée chez l'agneau.

Afin de poursuivre les essais d'efficacité et d'établir une solide preuve de concept, des études réalisées chez l'animal sont encore nécessaires. Aujourd'hui, nous souhaitons évaluer la possibilité d'utiliser notre immunostimulant néonatal chez le porcelet et évaluer la dose nécessaire pour une meilleure efficacité.

Sachant que les porcelets sont immunostimulés au premier jour de leur vie, cinq truies gestantes sont incluses dans le protocole. D'après les données zootechniques fournies par l'éleveur indiquant un taux de natalité moyen par truie de 13,6 petits et prévoyant un mort-né par portée, le nombre de porcelets inclus dans l'étude est estimé à soixante (60 maximum), en plus des 5 truies. Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour mesurer l'efficacité vaccinale, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit à son minimum grâce aux données zootechniques d'élevage et au plan d'expérience utilisé pour optimiser le maximum de données scientifiques avec l'utilisation de la totalité des porcelets nés des 5 truies. Raffinement : Les porcelets seront maintenus sous la mère jusqu'au sevrage (enrichissement maternel), .

La durée de l'expérimentation est d'environ 7 mois, en tenant compte de la mise en reproduction des truies.

1908- L'objectif de ce projet est de développer un nouveau médicament qui sera utilisé dans la greffe d'organe. L'organe greffé est considéré comme un corps étranger et induit une réaction de rejet après son implantation. Pour éviter cette réaction, on administre aux patients un traitement d'induction ou sérums anti-lymphocytaires (SAL) qui, en limitant cette réaction de rejet, permet l'implantation du greffon dans de bonnes conditions. Ces immunoglobulines sont obtenues par immunisation de lapins ou autres espèces animales contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets) et purifiées à partir de ces sérums immuns. Cependant ces SAL présentent des effets secondaires graves à court et long terme, dus à des sucres présents sur le produit.

Afin de réduire ces effets secondaires, l'équipe en charge du projet a développé un porc génétiquement modifié qui ne porte pas ces sucres, ce qui permet d'obtenir un nouveau traitement à effets secondaires réduits, voire nuls, pour le plus grand bénéfice des patients.

Des études préliminaires ont permis d'optimiser la procédure d'immunisation de ces porcs et d'obtenir un sérum immun efficace, ainsi que des immunoglobulines d'un titre et d'une affinité satisfaisante pour les applications thérapeutiques proposées.

Le produit est en phase finale de son développement et devrait être introduit chez les patients en 2016 (phase I). Pour cela, il est nécessaire de produire le médicament en quantité suffisante pour couvrir cette phase finale de développement (toxicité/tolérance préclinique) et en disposer à temps pour traiter les premiers malades.

Remplacement : Il n'existe pas de technique de remplacement permettant la production des sérums anti-lymphocytaires

Raffinement : l'ensemble des injections et des prélèvements seront réalisés après tranquillisation des animaux, les porcs seront hébergés dans un milieu enrichi par des ballons ou des chaînes suspendues.

Réduction : l'étude préliminaire a permis d'optimiser les rendements de purification et de réduire le nombre de porcs immunisés pour couvrir les besoins cette phase finale de développement, un maximum de 9 porcs sera utilisé dans ce projet

1909- Les maladies autoimmunes (MAI) représentent aujourd'hui la troisième cause de mortalité dans les pays développés après les affections cardio-vasculaires et le cancer. Il existe plus de 80 MAI parmi lesquelles le psoriasis représente le plus grand nombre de patients pour lesquels les besoins médicaux restent insatisfaits. En effet, la prise en charge du psoriasis fait appel à des traitements présentant de nombreux effets indésirables, un fort taux de non-réponses et des taux d'échappements thérapeutiques importants. Le psoriasis est dû entre autre à un dysfonctionnement du système immunitaire, qui infiltre de manière massive la peau et induit une inflammation parfois sévère entraînant une hyperprolifération des cellules de la peau.

La voie de l'interleukine 7 (IL-7) et de son récepteur (IL-7Ra) a été identifiée comme cible thérapeutique prometteuse dans la littérature dans divers modèles de maladies autoimmunes chez la souris, en revanche aucune étude ne fait état du rôle de l'IL-7 et de son récepteur dans le psoriasis. Le projet présenté ici consiste à évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps bloquant le récepteur de l'IL-7 dans un modèle préclinique de psoriasis chez la souris.

Le nombre d'animaux utilisé sera de 50 souris C57BL/6 pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus convenablement possible.

1910- L'obésité s'accompagne d'une inflammation chronique dite de bas grade à l'origine d'un grand nombre de désordres métaboliques dont le diabète de type 2. Le tissu adipeux est un véritable organe endocrine qui sécrète de nombreuses molécules inflammatoires. Ces molécules sont à l'origine d'une inflammation localisée au niveau du tissu adipeux. Cependant,

ces facteurs pro inflammatoires peuvent avoir une action plus systémique. Ainsi, la production et la circulation de ces molécules ont des conséquences néfastes sur le fonctionnement de divers organes tels que le foie ou le tissu adipeux entraînant une insulino-résistance qui pourra évoluer en un diabète de type 2.

De surcroît, le diabète de type 2 est à l'origine de nombreuses complications, notamment au niveau de l'appareil cardiovasculaire et du système nerveux central. En effet, les personnes diabétiques ont une plus grande susceptibilité aux accidents vasculaires cérébraux et les dysfonctionnements centraux en résultant sont généralement plus importants que chez les personnes non-diabétiques. De plus, il semble que les personnes diabétiques, tout comme les modèles animaux de diabète, présentent des déficits cognitifs et une susceptibilité aux maladies neurodégénératives plus importants. Enfin, l'inflammation et l'hyperglycémie perturberaient l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et pourraient moduler l'activité neurogénique (genèse de nouveaux neurones).

A travers ces expérimentations, nous souhaitons étudier l'impact de l'hyperglycémie sur :

1) l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

2) la neuro-inflammation via la modulation de l'expression des adipokines et de leurs récepteurs dans le cerveau du poisson zèbre.

3) l'impact sur l'activité neurogénique.

Cette étude sera réalisée sur 60 poissons zèbre maximum. De part des mécanismes physiologiques fortement conservés au cours de l'évolution, le poisson zèbre présente l'avantage d'être un modèle simplifié pour la modélisation de maladies humaines, ainsi que pour la découverte et le développement de composés pharmaceutiques. Aujourd'hui, le poisson zèbre est reconnu pour sa pertinence dans l'étude d'un certain nombre de mécanismes physiologiques transposables à l'Homme. Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

Remplacement : des études in vitro ont déjà été menées. Il semble indispensable de passer au modèle animal pour mieux comprendre les effets de l'hyperglycémie sur des paramètres physiologiques à l'échelle organique.

Réduction : les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible, tout en permettant de réaliser des études statistiques (student t-test).

Raffinement : les poissons seront placés dans des conditions optimales (cycle jour/nuit : 14h/10h ; température : 28.5°C ; oxygénation). Les animaux seront nourris plusieurs fois par jour, et toute manipulation invasive sera suivie d'une anesthésie générale.

1911- Environ la moitié des patients atteints de cancer sont traités par radiothérapie externe. Cependant, le taux de rechute pour les cancers les plus avancés atteint environ 50%. Un des facteurs qui limite les effets physicochimiques de la radiothérapie est l'hypoxie du tissu tumoral (insuffisance en oxygène). Or, quelques études récentes, notamment de notre laboratoire, font consensus pour dire que la radiothérapie normofractionnée (délivrée en plusieurs petites doses quotidiennes) améliore la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux et donc réduit l'hypoxie. Ceci suggère la radiothérapie devient plus efficace au fur et à mesure du traitement grâce à une réoxygénation.

Grâce aux progrès de la physique médicale, les schémas de délivrance de radiothérapie sont aujourd'hui en forte évolution, avec par exemple des doses par fraction plus élevées. Or, le peu de données existantes suggèrent que les vaisseaux pourraient réagir différemment à des doses plus fortes. Ceci pourrait remettre en cause certains des effets bénéfiques de la radiothérapie telle que pratiquée aujourd'hui. C'est pourquoi nous voulons tester l'impact de différents schémas de radiothérapie sur la vascularisation tumorale dans des modèles sous-cutanés chez la souris.

Pour cela, les tumeurs seront générées par greffe de cellules tumorales et traitées par radiothérapie. D'une part, les tumeurs seront prélevées (sur animaux euthanasiés) et analysées par immunohistochimie pour déterminer l'impact des différents protocoles de radiothérapie au niveau tissulaire (zones sans oxygène, zones perfusées, densité en vaisseaux sanguins, prolifération tumorale, etc...). D'autre part, nous utiliserons un appareil d'échographie expérimental (micro-doppler) pour tenter de visualiser les changements vasculaires en cours de traitement de manière non invasive, en vue de transférer cette technique chez les patients.

Les paramètres étudiés n'existent que dans un tissu intégré dans l'organisme; il n'existe donc pas de procédure de remplacement in vitro. Afin d'établir les groupes expérimentaux, un nombre total de 200 souris nude (NMRInu) et 200 souris C57BL/6 est estimé. Pour leur confort, les animaux sont hébergés en groupe invariable (5 max) avec enrichissement et surveillés quotidiennement.

1912- Le nombre de cancers mammaires et testiculaires a doublé depuis une trentaine d'années, en particulier dans les pays industrialisés où la quantité et la variété de nouvelles molécules d'origine industrielle présentes dans l'environnement ne cessent d'augmenter. Malgré l'amélioration du diagnostic et des traitements, les mécanismes (i) de réponse aux molécules qui miment ou perturbent les effets des hormones naturelles comme les oestrogènes (hormones féminines), et (ii) de résistance aux traitements anticancéreux restent mal connus. Dans ce sens, la mise en évidence de nouveaux traitements reste l'objectif primordial. Chez l'être humain, un nouveau récepteur alpha des estrogènes (ER α 36) a été observé et permet de différencier les tumeurs du sein agressives et les tumeurs non agressives. Le rôle clef de ER α 36 dans (i) le contrôle de la prolifération des cellules tumorales testiculaires et mammaires, (ii) la survie des cellules souches cancéreuses et (iii) la résistance à certains traitements du cancer du sein ont également été montrés en utilisant des cultures de cellules. Ce projet vise à confirmer ou non, chez la souris qui n'exprime pas naturellement ce récepteur ER α 36, l'importance de ce dernier dans l'apparition des tumeurs testiculaires et mammaires après exposition des animaux à un mélange de polluants industriels capable de mimer les effets des oestrogènes : les alkylphénols. Pour ce faire, nous utiliserons 2 lots de souris modifiées génétiquement porteuses du

récepteur ER α 36 humain, soit dans les cellules de la reproduction, soit dans la glande mammaire. La présence de ER α 36 dans le génome des animaux de 3 semaines (sevrage) sera vérifiée en réalisant un prélèvement de tissu à l'oreille après anesthésie locale. L'utilisation d'un troisième lot (de référence ou témoin) non porteur du récepteur permettra de valider les résultats obtenus. Les souris seront exposées ou non à différentes doses du mélange d'alkylphénols pendant la vie fœtale et néonatale. Les doses sont choisies pour être représentatives de l'exposition mesurée dans les populations humaines. Le mélange sera administré, pendant la gestation, aux mères des animaux analysés par addition de quantités contrôlées d'alkylphénols dans la nourriture ou par gavage manuel de nourriture contaminée par les alkylphénols. Après exposition au mélange, nous analyserons la fertilité des descendants pendant 3 générations, le développement et le fonctionnement des organes sexuels (testicules, ovaires, glande mammaire) ainsi que l'éventuelle apparition de lésions cancéreuses. L'expérimentation sera menée sur des animaux portant, de préférence, une seule copie du récepteur ER α 36 afin que chaque croisement génère 50% d'animaux non porteurs qui constitueront alors un groupe de référence (Réduction). Les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster, à la baisse, le nombre d'animaux nécessaires aux deuxième et troisième séries en fonction des résultats observés lors de la première série (Réduction). Par ailleurs, ces expérimentations viennent en complément de nombreuses expérimentations sur des cultures de cellules qui nous ont permis de poser nos hypothèses de travail : néanmoins, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans le domaine de l'étude du cancer. Enfin, en conformité avec la règle des 3R, les animaux sont placés en cages multiples et le bien-être des animaux fait l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (perte de poids importante, présence de tumeurs) au cours des expériences (Raffinement). Au total, 684 animaux seront utilisés pour ce travail prévu sur trois ans et quatre générations.

1913- Du fait de l'augmentation continue de la durée de vie des êtres humains, l'incidence des maladies associées à l'âge a significativement augmenté lors de ces dernières décennies. L'âge est effectivement considéré comme le principal facteur à risque de maladie sévère chez l'être humain. Une meilleure connaissance du processus de vieillissement au niveau moléculaire et cellulaire contribuera à la compréhension des maladies liées à l'âge et au développement d'approches thérapeutiques très spécifiques permettant aux êtres humains de vieillir dans les meilleures conditions. Ces différentes approches ont été choisies par les chercheurs de ce projet afin d'être analysées chez l'animal de laboratoire avant de faire l'objet d'analyse chez l'être humain.

Des processus aussi complexes que le vieillissement ne peuvent pas être correctement étudiés *ex vivo*. Le vieillissement mais aussi la genèse des dysfonctionnements organiques impliquent des mécanismes complexes de régulation et des interactions au sein de l'organisme dans son ensemble. Ils ne peuvent être considérés comme des phénomènes isolés analysables au sein d'un seul type de cellule ou de tissu.

Pour ce projet, 4340 souris pourront être utilisées dans les 5 ans. (procédure 1 : 300 animaux + procédure 2 : 200 + procédure 3 : 3840 animaux = 4340 animaux).

Le nombre d'animaux choisis pour ces procédures est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatif.

La souris est un animal utilisé dans ce type de projet depuis de nombreuses années. C'est un mammifère dont l'anatomie et la physiologie sont proches des hommes ce qui permet d'obtenir des informations fiables et pertinentes. La disponibilité de très nombreuses données historiques chez cette espèce permet d'analyser les données obtenues avec beaucoup de précision et de pertinence. Les animaux seront hébergés dans un environnement adapté à leur espèce, au nombre et à leur âge, dans un milieu enrichi (carré de cellulose déposé dans leurs cages). Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien et des points limites sont clairement identifiés afin d'éviter tout animal en souffrance.

1914- L'objectif de ce projet est d'obtenir un greffon osseux synthétique, vascularisé, de taille et de volume prédéfinis qui sera utilisé pour réparer une perte de substance osseuse.

Pour cela nous nous sommes intéressés au modèle du pédicule vasculaire isolé. Il s'agit d'isoler une artère et une veine et les mettre en contact avec le greffon synthétique ce qui permettra de le vasculariser. Les études précliniques réalisées à ce jour sont nombreuses et sur de multiples modèles (rat, lapin, chien). Pour ce projet, nous reproduisons le modèle du lapin afin d'évaluer notre approche.

Selon les recommandations scientifiques un minimum de 6 lapins (6 sites) par groupe est nécessaire pour permettre d'effectuer des tests statistiques. Nous avons prévu un total de 12 lapins. 6 lapins dans le groupe 1 (greffon synthétique seul), 6 lapins dans le groupe 2 (greffon synthétiques associé à des cellules autologues pour stimuler la vascularisation et la formation osseuse).

Notre étude prévoit une surveillance de la consolidation osseuse et de la vascularisation du greffon à l'aide de différentes techniques d'imagerie non invasives et largement utilisées chez l'Homme (radiologie). La règle des 3R a été appliquée afin de :

- Remplacer l'utilisation des animaux : au vu de l'approche thérapeutique abordée dans ce projet, il n'existe pas d'autres méthodes permettant d'éviter ou remplacer l'utilisation des animaux ;

- Réduire : au vu des objectifs visés pour le projet sur la base des données bibliographiques et les tests statistiques prévus, un nombre minimum d'animaux sera inclus sans pour autant entraver l'objectivité scientifique du projet (n=6 par groupe) :

Il est prévu un calcul statistique sur la base du nombre d'animaux par groupe:

- La repousse osseuse sera mesurée dans les défauts comblés avec le biomatériau seul (témoin) ou le biomatériau avec les cellules souches autologues. Les résultats seront exprimés par la moyenne +/- l'écart type.

• Pour une différence de 40% de repousse osseuse entre les 2 groupes, une valeur de $p < 0,05$ et une puissance de 0,9, le calcul statistique indique $n=5$ /groupe. Nous avons choisi $n=6$ /groupe pour compenser une mortalité éventuelle en cours de l'étude.

- Raffiner : les manipulations se dérouleront dans le strict respect du bien être des animaux. A cet effet, l'hébergement est assuré dans des cages individuelles en post-opératoire immédiat le temps de la cicatrisation (7 à 10 jours) conformément à la réglementation en vigueur. Par la suite, les animaux seront mis en lot par 3 lapines dans des cases au sol sur copeaux de bois pour la durée totale de l'étude. Les animaux sont observés, examinés et soignés quotidiennement. Des traitements adaptés seront mis en place en cas de besoin. Les animaux ont accès librement aux granulés spéciaux pour lapins et à l'eau de boisson (ad libitum). L'enrichissement du milieu se fait par des jouets (blocs en bois) et une tablette surélevée permettant aux lapins de passer au dessus ou de s'abriter en dessous par des ouvertures adaptées évitant la luminosité environnante en cas de besoin.

- les manipulations ont été regroupées (chirurgies et anesthésies). Les animaux seront surveillés quotidiennement. Les points limites ont été définis a priori : infection du site opératoire résistant à l'antisepsie locale et à l'antibiothérapie. Souffrance durable « dommages irrémédiables ».

L'intérêt de ces travaux est de proposer un greffon osseux synthétique sur mesure, sans sacrifice musculaire et avec une morbidité limitée et évaluer l'apport des cellules

1915- Objectifs :

Afin de garantir la sécurité chimique des aliments, les composés β -agonistes sont prohibés en Europe depuis 1988 en tant que promoteurs de croissance chez les animaux de rente. De telles pratiques sont néanmoins autorisées dans certaines parties du monde, notamment l'usage de ractopamine chez le porc charcutier en Amérique du Nord, et parfois suspectées en Europe. Les méthodes classiques dites ciblées permettent de manière routinière de contrôler une quarantaine de β -agonistes, cependant, la simplicité relative des procédés de synthèse pour ce type de molécules permet d'envisager une possible circulation sur le marché noir en Europe de substances dont la structure chimique n'a pas encore été officiellement décrite. Cette hypothèse de travail a conduit le LNR français compétent en la matière à développer dès 2007 des stratégies de criblage non plus ciblées uniquement sur les molécules natives ou leurs métabolites mais sur des marqueurs moléculaires d'effet consécutifs à l'administration de la dite substance connue ou pas. Ces approches dites non ciblées ou métabolomiques sont depuis 2013 utilisées officiellement en France pour le contrôle officiel, chez les bovins. Il convient aujourd'hui de développer la connaissance correspondante chez les porcins afin de pouvoir envisager la mise en œuvre d'une stratégie similaire dans le cadre des Plans de Surveillance et des Plans de Contrôle (PSPC) français.

- Déterminer la cinétique d'élimination/fixation de ractopamine (composé β -adrénergique) dans différentes matrices porcines facilement prélevables (urine, sérum, poil).

- Après euthanasie, étude de la fixation dans les matrices suivantes : poumon, muscle, rétine, rein, foie

- développer une stratégie analytique de dépistage des animaux (métabolomique) par la mise en évidence de biomarqueurs d'administration.

Matériels et méthodes (simplifié):

1. Espèces cible: Porc charcutier, deux groupes d'animaux seront définis :

a. 1 groupe « témoin » ($n=5$) : non traités

b. 1 groupe « traités » ($n=5$) : administration journalière via l'alimentation de ractopamine (10 ppm)

L'ensemble des animaux seront abattus après les 4 semaines de protocole.

2. après abattage des animaux, une autopsie sera réalisée ainsi que des prélèvements post-mortem.

Résultats :

Une cartographie de fixation des résidus de ractopamine dans différents tissus sera réalisée afin de déterminer la matrice la plus pertinente à retenir pour mise en œuvre au sein des PSPC de stratégies de contrôle pertinentes de l'usage de ce promoteur de croissance interdit en Europe (Dir 96/22/EC, Dir 96/23/EC).

En parallèle, une stratégie innovante de dépistage de l'utilisation de ractopamine sera mise en œuvre par approche métabolomique, méthode de détection non ciblée permettant de rechercher d'éventuels biomarqueurs, à l'échelle de l'individu à partir de prélèvements urinaire, sanguins et musculaires.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le protocole d'essai contrôlé après administration puis abattage (« controlled trials test ») est le seul valide pour conclure aux effets induits par la molécule anabolisante et permettre sa détection de manière ciblée (abattage et autopsie) et non ciblée (métabolomique). Il implique, par là même, l'emploi de porcs susceptibles d'être dopés comme animal expérimental. Le protocole d'administration n'influe pas sur les conditions d'élevage et sur l'état de santé des animaux, en dehors de modifications morphologiques et de performance. Les prélèvements planifiés sont ceux réalisés couramment en élevage (prise de sang) et non traumatique (prise d'urine, prélèvement de poils). La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (5 animaux par lot).

La règle des 3R a été appliquée afin de :

- Remplacer l'utilisation des animaux : au vu de l'approche scientifique abordée dans ce projet, il n'existe pas d'autres méthodes permettant d'éviter ou remplacer l'utilisation des animaux. L'objectif étant de déterminer, chez le porc, des marqueurs d'administration de composés anabolisants, la ractopamine en particulier, les β -agonistes en général, l'expérimentation ne peut être conduite que sur ce type d'animaux, afin d'étudier la réponse métabolique propre à l'espèce.

- Réduire : en ce qui concerne le nombre d'animaux impliqués dans l'expérimentation, l'effectif de 5 « traités » + 5 « contrôles » correspond au strict minimum autorisant le traitement statistique des données qui seront collectées et analysées dans le cadre de l'étude métabolomique.

- Raffiner : les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce selon la réglementation en vigueur. Les boxes individuels mesurent au minimum 2m², les animaux seront hébergés par lot de deux porcs dans deux boxes communicants grâce à une trappe de 80cmx80cm (LxH) ce qui permet d'héberger deux porcs sur un espace commun (plus de 4m² additionnés) mais avec un compartiment pour chaque animal.

o Enrichissement du milieu : mise à disposition de jouets spécifiques, les animaux sont observés et examinés quotidiennement, rationnés et ont accès librement à l'eau de boisson (ad libitum) ;

o Les animaux vivent en groupe (par deux) ;

o Visite quotidienne assurée par les animaliers (contact avec les porcs) ;

o Examen clinique une fois par semaine assuré par le vétérinaire pour déceler toute pathologie ;

o Compte tenu des manipulations sans gestes invasifs, il n'est pas prévu de procédure de réduction de douleur.

1916- L'œil est l'organe majeur de la vision. Il a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse contenue dans les photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de phototransduction. Ce mécanisme se déroule au niveau de la couche la plus interne de l'œil, la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs rétiniens. Il existe deux types de photorécepteurs : (i) les bâtonnets, très sensibles à la lumière et responsables de la vision nocturne et (ii) les cônes, responsables de la vision diurne et chromatique. Les dystrophies rétiniennes héréditaires (DRH) sont des maladies neuro-dégénératives de la rétine dont la prévalence dans la population générale est d'environ 1 cas pour 4000 personnes. Les DRH regroupent notamment les rétinites pigmentaires (RP) caractérisées par une dégénérescence des photorécepteurs bâtonnets puis cônes et une perte progressive de la vision nocturne puis diurne. A ce jour, des mutations dans plus de 45 gènes ont été associées à des rétinites pigmentaires chez l'homme. Parmi ces mutations, celles touchant les gènes codant pour l'enzyme phosphodiesterase (PDE6) sont associées à une des formes les plus fréquentes de RP autosomique chez l'homme (8%). Plusieurs travaux ont démontré que la pro-insuline avait une activité anti-apoptotique et qu'elle était capable de retarder l'apoptose des photorécepteurs (notamment des cônes) dans des modèles murins de rétinites pigmentaires (souris rd10, rat P23H). Le but de notre projet est d'évaluer l'efficacité de la pro-insuline dans un modèle de dégénérescence rétinienne proche de celle observée chez l'homme. Nous allons donc tester l'efficacité de la pro-insuline chez le chien Setter Irlandais rod-cone dysplasia 1 (Rcd1), un modèle canin naturel de rétinite pigmentaire liée à un défaut en Pde6- β qui code une enzyme exprimée dans la partie photosensible des photorécepteurs bâtonnets. La rétine est une structure complexe composée de multiples couches de neurones et de cellules nourricières. Il n'est pas possible de reconstituer cet organe complexe in vitro. L'utilisation de modèles animaux atteints de DRH est donc la seule alternative pour étudier les effets du transfert de gènes dans la rétine avant de débiter des études cliniques chez l'homme. Le modèle canin est un modèle proche de l'homme car la taille et l'anatomie de l'œil du chien sont beaucoup plus proches de celles de l'homme que ne sont celles des rongeurs. La pro-insuline sera exprimée dans les cellules rétiniennes grâce aux vecteurs dérivés du virus adéno-associés (AAV) qui sont capables de transduire de manière très efficace plusieurs types cellulaires du tissu rétinien et d'induire une expression stable sur le long-terme chez la souris, le rat, le chien et le primate à la suite d'une injection intraoculaire. Nous utiliserons les sérotypes AAV2/4 et AAV2/5 qui apparaissent comme les vecteurs les plus efficaces pour la transduction des photorécepteurs ou de l'épithélium rétinien après injection sous-rétinienne chez le rat ou le chien. L'étude se déroulera en deux étapes : dans un premier temps nous testerons la toxicité des vecteurs codant la pro-insuline chez le rat (n=10 rats). Si nous n'observons d'effets toxiques, nous évaluerons dans un second temps l'efficacité des vecteurs AAV2/5h CMV.pro-insuline et AAV2/8 hCMV.proinsuline chez 12 chiens Pde6 β -/-. Tous les examens cliniques et les injections sont réalisés avec sédation et anesthésie appropriées en présence d'un vétérinaire anesthésiste. L'état général et l'alimentation des animaux (chiens et rats) sont surveillés quotidiennement par les animaliers et le vétérinaire référent du Centre de Boisbonne.

Les animaux seront donc séparés en différents lots pour cette étude :

2 lots de rats :

-1 lot de rat (n=5) injecté avec l'AAV 2/5 pro insuline.

-1 lot de rat (n=5) injecté avec l'AAV 2/4 pro insuline.

4 lots de chiens :

-1 lot de 3 chien pDE6 -/- - injectés avec l'AAV 2/5 pro insuline et suivis pendant 6 mois.

-1 lot de 3 chien pDE6 -/- - injectés avec l'AAV 2/4 pro insuline et suivis pendant 6 mois.

-1 lot de 3 chien pDE6 -/- - injectés avec l'AAV 2/4 pro insuline et suivis pendant 9 mois.

-1 lot de 3 chien pDE6 -/- - injectés avec l'AAV 2/5 pro insuline et suivis pendant 9 mois.

Chaque lot comporte au moins 3 animaux. C'est le minimum requis pour une interprétation fiable des résultats sachant qu'il existe une certaine variabilité individuelle.

Cette étude nous permettra d'évaluer l'effet antiapoptotique de la proinsuline sur la dégénérescence des photorécepteurs et son éventuelle utilisation pour traiter les patients atteints de dystrophies rétiniennes héréditaires.

1917- Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations dues aux effets secondaires importants et/ou à l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test du labyrinthe en croix surélevé (LCS) est l'un des modèles d'anxiété les plus utilisés chez le rongeur. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Ce test est basé sur l'aversion innée des rongeurs pour les espaces ouverts. Dans cette situation, le rat est placé dans la partie centrale d'un labyrinthe en forme de croix surélevé par rapport au sol. Il est composé de 2 branches ouvertes opposées et de 2 branches fermées elles-mêmes opposées. Un animal normal évite les branches ouvertes tandis qu'un animal traité avec un agent anxiolytique explore de manière accrue cet espace.

Le comportement des animaux dans ce test est sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont, de manière non exhaustive, la souche de rat, le stress engendré par les manipulations, la luminosité... Dans cette étude, l'influence de l'intensité lumineuse va être

évaluée. En effet, les effets de nouveaux traitements potentiels peuvent ne pas être détectés si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable. La maîtrise de ses facteurs et notamment de la lumière, un facteur anxiogène de ce test, est déterminante pour la qualité des études réalisées.

L'objectif du présent projet est de comparer le comportement de type anxieux des rats placés dans trois conditions d'intensité lumineuse et traités avec le véhicule ou le Diazépam, molécule de référence dans le traitement de l'anxiété.

Dans ce projet, 60 rats seront utilisés, en 6 lots de 10 animaux. Trois lots seront traités avec le véhicule et trois lots avec le Diazépam et chaque lot sera soumis pendant le test à une intensité lumineuse différente (40, 60 et 80 lux). Les animaux seront placés dans le LCS pendant 5 minutes et leur comportement enregistré. Aucune douleur n'est induite par ce test. Les animaux seront mis à mort à l'issue de ce test.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la variabilité dans le modèle en fonction de l'intensité lumineuse, ce qui permettra à l'avenir de réaliser des calculs de puissance statistique pour déterminer le nombre optimal d'animaux à utiliser pour chaque étude. Cela évitera d'utiliser trop (réduction) ou trop peu (raffinement) d'animaux et de permettre ainsi l'exploitation des résultats. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins d'expérimentation animale, les animaux de ce projet auront déjà participé à un projet précédant avec une sévérité de classe modérée et après avis favorable du vétérinaire référent

1918- Les anomalies touchant la partie postérieure du cerveau, appelée cervelet, peuvent résulter de défauts du développement in utero ou de processus neurodégénératifs, plus tardifs. Chez les enfants atteints, ces anomalies se traduisent par des troubles de la fonction motrice de type ataxie mais aussi fréquemment par des anomalies cognitives telle que des déficiences intellectuelles (DI). Pour près de la moitié des patients, il n'est pas possible de proposer un diagnostic et il n'existe pas de traitement pour la quasi-totalité de ces pathologies. Parmi celles-ci, il existe un groupe de maladies génétiques associant un développement cérébelleux anormal, DI et une anomalie du métabolisme des sucres, appelée glycosylation des protéines.

Le premier objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes cellulaires en cause à travers l'étude d'une de ces pathologies touchant la glycosylation des protéines. Le but est d'identifier un mécanisme qui touche spécifiquement le développement du cerveau et du cervelet et il n'est pas possible d'accéder à des tissus humains pour une telle étude. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle qui possède ces organes et la conservation importante des structures cérébelleuses chez les rongeurs font de la souris un modèle de choix.

Pour comprendre la mise en place de cette pathologie, nous souhaitons générer un modèle de souris mutées pour le gène en cause et comparer leurs cerveaux et leurs cervelets à ceux de souris non mutées. Des résultats préliminaires et des études par culture cellulaire ont déjà permis de cibler les processus cellulaires à étudier tel que la migration neuronale et la mort cellulaire et ainsi utiliser un nombre d'animaux réduits. Au total, 288 souris seront étudiées et euthanasiées aux stades précoces de l'appariation du phénotype, avant la mise en place de troubles neurologiques sévères potentiels. Le cervelet de ces souris sera étudié à l'aide de techniques histologiques avec comme but l'identification d'un phénotype sur la base de critères morphologiques.

Le deuxième objectif de ce projet est l'identification de nouveaux gènes mutés dans des syndromes de DI et anomalie cérébelleuse. Une des approches les plus efficaces pour modéliser des défauts génétiques identifiés chez l'homme est basé sur l'utilisation du poisson-zèbre et un total de 900 embryons sera généré. Le poisson-zèbre possède un cerveau postérieur dont la structure est conservée avec l'homme et il permet de reproduire, relativement facilement, les anomalies génétiques identifiées chez l'homme, à l'aide d'une technique d'injection aux premiers stades de développement.

L'établissement de ces nouveaux modèles de syndromes cérébelleux pourra permettre d'améliorer le diagnostic chez les patients et d'envisager des thérapies.

1919- Dans les systèmes d'élevage de poulets de chair, la mortalité des poussins est plus grande pendant les 10 premiers jours de vie. Pendant cette période, les poussins sont soumis à plusieurs sources de stress telles que des changements de température, de confinement, des vibrations pendant leur transport entre le couvoir et leur installation en bâtiment d'élevage et, la plupart du temps, ils sont privés d'eau de boisson et de nourriture. Si les poussins peuvent puiser leurs ressources dans le sac vitellin pendant les jours qui suivent l'éclosion, il est maintenant bien démontré que leur environnement précoce influence le comportement des poulets plus âgés, leurs performances de production et leur sensibilité aux maladies. Pour réduire l'usage des antibiotiques et respecter le bien être des poulets dans les systèmes d'élevage, la gestion de la santé des animaux doit évoluer vers le développement de nouveaux moyens prophylactiques et thérapeutiques. Comme un état de stress persistant représente un risque potentiel de problèmes de santé à venir, son dépistage peut contribuer à une meilleure gestion de la santé des animaux et permettre de proposer des pratiques d'élevage pour atténuer les expériences négatives vécues par les jeunes animaux. Une étude précédente menée par notre laboratoire a montré que la mise en élevage retardée (MER) de poussins de chair pendant 24h (absence d'eau de boisson, d'aliment, simulation de transport et variation thermique) diminuaient significativement leur croissance jusqu'à l'âge d'abattage (J34).

Nous formulons l'hypothèse que la résilience des poussins vis-à-vis de ce stress précoce pourrait être augmentée par l'apport d'un probiotique dans les heures qui suivent la mise en élevage (ME) car cet apport contrôlé de bactéries favoriserait l'établissement d'un microbiote digestif équilibré. Le microbiote intestinal influence l'immunité, le développement et le métabolisme de l'hôte. Par conséquent, nous allons évaluer si cet apport contrôlé de bactéries permet d'améliorer l'état de santé du jeune, voire de prévenir les effets néfastes d'une mise en élevage retardée (MER). Les principales étapes du projet sont 1) de tester la façon d'apporter le probiotique en observant les effets à court terme (J13), 2) d'évaluer les conséquences en termes de croissance, de comportement et de santé à long terme (J34).

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

REMPLACEMENT : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Pour éviter un élevage de 5 semaines inutiles, nous allons faire une expérience 1 sur les effets à court terme, puis nous adapterons la méthode de distribution du probiotique si besoin avant d'entamer l'expérience proprement dite (Expérience 2) qui vise les effets à long terme. Pour l'analyse du comportement social des groupes, nous utilisons le minimum d'unités imposé par la variabilité que nous connaissons sur ce comportement, à savoir 6 sous-groupes. Pour l'expérience 1, nous utiliserons 6 poussins par sous-groupes, soit 144 (4x6x6) poussins au total, car c'est le nombre minimal nécessaire pour bien mesurer la consommation alimentaire. Dans l'expérience 2, nous utiliserons 16 poussins par sous-groupes, soit 384 poussins au total (4x6x16) car 4 sont destinés à la réalisation de prélèvements tissulaires et 12 sont nécessaires pour espérer détecter une différence de prévalence de certaines maladies, en particulier locomotrices. A la fin de l'expérimentation, 240 animaux retournent en élevage.

RAFFINEMENT : Les poussins seront hébergés sur des parquets à une densité très inférieure au maximum autorisé. Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer une plateforme. Ils seront visités deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendra l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

1920- Un animal transgénique a acquis une modification de son génome suite à une manipulation expérimentale telle la microinjection. Cette modification doit être transmise à la descendance de manière à pouvoir établir des lignées d'animaux transgéniques.

La production de souris transgéniques par microinjection constitue des outils expérimentaux qui permettent d'étudier des questions d'intérêts biologiques sur un animal vivant. La création d'un modèle de souris transgénique nécessite l'utilisation d'une centaine de souris. Nous envisageons de créer environ 10 lignées par an sur la durée du projet (5 ans), ce qui devrait impliquer un nombre total de 5625 souris au maximum. Cette technique a été optimisée depuis de nombreuses années afin de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, en accord avec la règle des 3R. La création de lignées de souris transgéniques permet d'étudier l'impact de la dérégulation d'un gène, au travers le phénotype de l'animal dans son ensemble et le métabolisme de tissus ciblés par l'expression de ce gène en particulier. Ces analyses permettent de mieux comprendre le rôle d'un gène et d'expliquer comment sa dérégulation peut être à l'origine de certaines pathologies par exemple. L'obtention de souris transgéniques permet aussi la création de modèles de pathologies génétiques et ouvre ainsi la porte à des essais de thérapies pour corriger les défauts observés avec des retombées potentielles en santé humaine et animale, tout en veillant quotidiennement au bien-être des animaux ainsi obtenus.

Dans le cadre de nos activités, les modèles murins créés visent à valider le rôle suspecté de certains gènes dans l'apparition de maladies génétiques récessives et l'importance d'autres gènes dans le déterminisme génétique de fonctions d'intérêt zootechnique, telles la reproduction, le développement et notamment celui du système nerveux. Les modèles ainsi créés contribuent à mieux comprendre l'apparition de certaines pathologies, à détecter des marqueurs précoces de leur développement et à tester des approches thérapeutiques.

1921- Les argiles défoliées sont employées en alimentation animale comme capteurs de mycotoxines dans les aliments. Elles peuvent également avoir un effet catalyseur sur les enzymes digestives, du fait de leur teneur importante en cations. L'objectif du projet est de caractériser l'effet de l'introduction d'argiles défoliées dans l'alimentation des porcs sur la digestibilité des nutriments et de l'énergie selon la teneur en fibres du régime. Le protocole prévoit 2 essais pour des mesures :

- au niveau fécal, pour évaluer la digestibilité dans l'ensemble du tube digestif ;
- au niveau iléal, pour évaluer la digestibilité dans la première partie du tube digestif et jusqu'à la fin de l'intestin grêle.

Dans chaque essai, les argiles défoliées seront incorporées à un régime de base standard ou fibreux et l'effet de l'introduction d'argiles défoliées et du niveau d'introduction sur l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie sera calculé par différence entre les régimes supplémentés et les régimes de base. Dans l'essai 1, 25 porcs (5 par régime) seront placés dans des cages pendant 18 jours pour une période d'adaptation aux conditions d'hébergement et d'alimentation (10 jours) et une période de mesure de l'ingestion et de collecte des fèces (8 jours). Dans l'essai 2, 5 porcs seront opérés pour la mise en place d'une anastomose iléo-rectale reliant la fin de l'intestin grêle au rectum et mis en cage pendant 3 semaines. Ensuite, chaque porc recevra successivement 5 régimes expérimentaux, puis un régime à très faibles teneurs en protéines et en lipides au cours de 5 périodes successives d'une semaine (4 jours d'adaptation au régime puis 3 jours de mesure de l'ingestion et de collecte des excréta).

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie chez les porcs et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Raffinement: l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digesta de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience. Réduction : le nombre d'animaux dans chaque essai (25 porcs dans l'essai 1 et 5 porcs dans l'essai 2) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité. Pour le premier essai (mesure de digestibilité au niveau fécal), il est nécessaire de prévoir 5 mesures par régime pour calculer un coefficient de digestibilité de la matière sèche avec une précision de 1%. Nous prévoyons de mesurer 5 régimes, soit un total de 25 animaux. Dans le deuxième essai, les mesures sont réalisées au niveau iléal et la variabilité entre les individus est réduite. Il est nécessaire de prévoir au moins 4 mesures par régime pour obtenir une précision satisfaisante. Nous prévoyons d'utiliser 4 porcs qui recevront successivement les régimes expérimentaux; compte-tenu de l'étape chirurgicale, nous prévoyons 1 animal supplémentaire pouvant se substituer à un animal défaillant en cours d'essai.

1922- Développer une bonne relation entre les animaux et leur éleveur est un enjeu de durabilité de l'élevage qui participe au bien-être des animaux, à la satisfaction personnelle des éleveurs et à l'amélioration des résultats économiques des exploitations. Certaines interventions en élevage porcin peuvent s'avérer aversives (caudectomie, vaccination,...) et entraîner des réactions de peur des humains. Nous cherchons à comprendre comment les humains sont perçus, et quelles interactions peuvent être positives pour la relation. Nous avons choisi de travailler sur les interactions acoustiques (voix humaine) peu étudiées alors que les porcs communiquent principalement par les voies acoustique et olfactive.

Les objectifs du projet sont de déterminer

1/ comment la voix humaine (et ses caractéristiques) est spontanément perçue par les porcelets sevrés (procédure 1) : timbre, ton...

2/ l'importance de l'utilisation de la voix lors du développement de la relation entre l'homme et l'animal (procédure 2).

L'étude portant sur le comportement des porcs, il n'est pas possible d'utiliser une méthode de substitution à l'emploi d'animaux vivants.

135 animaux seront impliqués dans les 2 procédures du projet. 45 participeront à la procédure 1 (soit 15 groupes de 3) et 90 à la procédure 2 (soit 30 groupes de 3). Les effectifs sont réduits au minimum afin d'assurer une validité statistique.

Les deux procédures n'engendreront pas de douleur, et devraient provoquer des stress de courte durée lors des tests comportementaux (choix, réactivité à l'homme ou manipulation), dus à l'isolement du groupe social et à la nouveauté de la situation. A leur retour dans la loge d'élevage, les animaux seront observés afin de s'assurer qu'ils retrouvent une alimentation normale et un comportement social. Si la situation de test s'avérait trop stressante pour un individu (cris, sauts contre les parois du parc de test...), pouvant engendrer des blessures, il serait retiré et remis dans son groupe. Les animaux à l'issue de l'expérience seront remis dans le parcours d'élevage classique.

1923- Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un choc hémorragique (par exemple : accidents de la route, plaie ouverte) développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire) et l'apparition d'un état d'immunosuppression.

Les cellules de l'immunité innée telles que les cellules NK et les cellules dendritiques jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'état d'activation du système immunitaire.

Afin d'éviter un emballement de notre système de défense et éviter ainsi l'apparition de maladies inflammatoires chroniques, les cellules NK ont la capacité d'éteindre l'activation des cellules de l'immunité (rôle anti-inflammatoire).

Suite au choc hémorragique on observe un changement phénotypique de ces cellules NK qui tendent vers une fonction anti-inflammatoire excessive. Cette réponse anti-inflammatoire excessive pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation à réagir contre une contamination bactérienne expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection.

Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes impliqués dans le changement phénotypique des cellules NK (1ère Partie) et de comparer l'effet de 2 glucocorticoïdes couramment utilisés aux urgences sur l'évolution d'une pneumonie bactérienne post-hémorragique (2ème Partie).

Pour cela nous aurons besoin de 1452 souris, soit 524 souris pour la 1ère Partie (constituée de 5 sous groupes), pour comprendre le changement phénotypique des cellules NK observé pendant le choc hémorragique. Et 928 souris pour la 2ème Partie (constituée de 9 sous groupes) où on pourra comparer l'effet des deux glucocorticoïdes utilisés aux urgences et voir comment ils pourraient agir directement sur les cellules d'intérêts et restaurer leur fonctionnalité. L'effet de ces traitements sera évalué en fonction de l'évolution de la pneumonie post hémorragique.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner).

Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude.

1924- L'apparition d'une infection bactérienne généralisée ou sepsis est l'une des principales causes de décès chez les patients de moins de 40 ans notamment par l'apparition d'infections secondaires nosocomiales. Cette infection généralisée s'accompagne d'une extinction des capacités de réaction du système immunitaire aussi appelé immunosuppression (IS). Cette IS prépare le terrain à l'apparition d'infections bactériennes secondaires ou nosocomiales. La gestion de ces infections nosocomiales à l'hôpital conduit à une utilisation massive d'antibiotiques générant un surcoût pour la collectivité et favorisant l'émergence préoccupante de souches multi-résistantes.

L'infection stimule un système complexe de défense de l'organisme, stimulation devant être adéquate, spécifique et transitoire de façon à éviter une activation aberrante du système immunitaire. Les lymphocytes T régulateur (Treg) remplissent cette fonction de contrôle du système immunitaire. Au cours de l'IS post-septique, il est observé une extinction du système immunitaire associée à une activation excessive des Treg.

Le but de notre étude est de mieux comprendre le rôle des lymphocytes Treg dans ce phénomène d'immunosuppression induit par le sepsis.

Le TNF alpha est connu comme étant une cytokine produite par l'organisme au cours du sepsis et activant les systèmes de défense de l'organisme. Dernièrement, il a été montré que cette molécule pouvait moduler l'activité des lymphocytes Treg et ainsi jouer un rôle clé au cours de l'apparition tardive du phénomène d'IS. Le TNF joue un rôle central dans l'activation du système immunitaire inné et adaptatif via son récepteur ubiquitaire TNFR1. Il semble aussi responsable lors des phases plus tardives de l'activation et de l'expansion des lymphocytes Treg via son récepteur à leur surface le TNFR2.

L'étude de ces mécanismes a comme objectif la découverte de thérapeutiques innovantes (anticorps anti TNFR2) dans la problématique de la maîtrise du risque infectieux nosocomial, en complément des thérapeutiques anti-infectieuses.

Pour cela, 1185 souris C57BL/6jRj femelles vont être utilisées. Ce protocole se divise en 3 parties :

- 1) Partie 1 : Caractérisation de l'immunosuppression lors d'une infection généralisée.
- 2) Partie 2 : Etude du rôle du récepteur de type 2 TNFR2 exprimé par les lymphocytes T régulateur.
- 3) Partie 3 : Développement d'une stratégie thérapeutique d'inhibition du récepteur TNFR2 par l'utilisation d'anticorps neutralisants.

1- Enfin,

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'effet immunosuppresseur du sepsis et le rôle correctif d'une biothérapie ciblée contre le TNFR2 ne peuvent pas être simplement réalisées de façon in vitro (faible corrélation in vitro-in vivo). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

1925- Suite à un traumatisme (hémorragie, trauma crânien,...), un phénomène d'immunosuppression apparaît chez les personnes admises dans les services de réanimation aboutissant à une augmentation de la probabilité de survenue d'une infection secondaire comme une pneumopathie.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont les 2 bactéries fréquemment responsables de ces infections. Ces bactéries expriment différents systèmes de virulence qui affectent la réponse immunitaire de l'hôte. Cette réponse immunitaire de l'hôte fait intervenir différents acteurs cellulaires tels que les polynucléaires neutrophiles et les macrophages alvéolaires. Récemment, il a été montré un rôle croissant des cellules NK ou natural killer dans la réponse de l'hôte à une infection bactérienne. Les cellules NK ont un rôle direct contre les bactéries et indirect en régulant l'activité du système immunitaire de l'hôte.

Le but de notre étude est :

- 1- de caractériser le rôle des cellules NK dans un modèle de pneumonie aiguë chez la souris ;
- 2- d'évaluer l'impact des facteurs de virulence sur la physiologie des cellules NK et la réponse de l'hôte ;
- 3- d'évaluer l'impact de la déplétion des cellules NK dans la souris préalablement à l'infection.

Pour cela, 1372 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une pneumopathie (infection des poumons) aux souris, les poumons des souris sont prélevés afin de réaliser diverses analyses (bactériologiques et inflammatoires).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle des cellules NK et l'influence des facteurs de virulence des bactéries nous permet d'appréhender les interactions intercellulaires (cellules NK-neutrophiles, cellules NK-macrophages) et permet leur étude au sein d'un microenvironnement infectieux très difficile à reproduire fidèlement in vitro. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Et le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

1926- L'endocardite infectieuse est une pathologie sévère associée à un taux élevé de morbidité et mortalité. Dans la plupart des cas, le staphylocoque doré est responsable de cette maladie.

Le principal traitement repose sur des antibiotiques intraveineux administrés sur de longues périodes. Ce traitement est long et souvent difficile car les lésions contenant les pathogènes sont difficiles à atteindre : il fait souvent appel à une association d'antibiotiques et se pratique sous perfusion en milieu hospitalier pouvant être source d'infections liées aux soins.

L'endocardite due au staphylocoque doré résistant à la méticilline est en général traitée par vancomycine, mais l'émergence de souches intermédiaires aux glycopeptides est source d'échecs thérapeutiques. Il apparaît donc urgent de trouver de nouvelles options thérapeutiques pour traiter les infections dues aux souches résistantes à la méticilline et aux glycopeptides.

Debio 1450 est un antibiotique à fort potentiel anti staphylocoque qui peut aussi bien être administré par voie orale que par voie intraveineuse (IV).

Le but de notre étude sera d'évaluer l'efficacité de l'antibiotique Debio1450 dans un modèle expérimental d'endocardite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez le lapin et de comparer cette efficacité avec celle de la vancomycine (antibiotique de référence), de la daptomycine et du linézolide.

Pour cela, 72 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés. Une endocardite bactérienne à SARM sera induite. Les animaux seront répartis dans 6 groupes : animaux contrôles (sans traitement), animaux traités avec Debio1450 (2 doses différentes), animaux traités avec de la vancomycine, animaux traités avec de la daptomycine et animaux traités avec du linézolide. Cinq jours après infection, les animaux seront euthanasiés et les végétations et la rate seront prélevées afin de déterminer les charges bactériennes.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de lapin a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude

1927- Les carcinomes de la glande mammaire, tumeurs solides d'origine épithéliale, sont la première cause des décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. En France et en Europe, la fréquence d'apparition du cancer de la glande mammaire chez la femme est en constante augmentation, et en 2005, environ 50 000 nouveaux cas ont été recensés en France. Les cellules de carcinomes mammaires possèdent un grand potentiel envahissant et métastasent. Dans ce cancer particulièrement, mais également dans de nombreux autres carcinomes, le microenvironnement tumoral joue un rôle crucial au cours de leur développement. Le microenvironnement tumoral est principalement constitué de nombreux types cellulaires, notamment des cellules endothéliales, immunitaires et de fibroblastes tumoraux englobés dans une matrice extracellulaire multiprotéique. En utilisant des modèles de cultures organotypiques en trois dimensions, mimant l'environnement derme/épiderme, notre équipe a démontré que les fibroblastes associés aux carcinomes (FACs) jouent un rôle déterminant dans le processus d'invasion collective des cellules tumorales. Ainsi, les FACs remodelent la matrice extracellulaire (MEC) et creusent des « chemins d'invasion » utilisés par les cellules tumorales. Au niveau moléculaire, l'équipe a récemment démontré que l'activation des fibroblastes « normaux » en fibroblastes pro-invasif est sous le contrôle d'une sécrétion autocrine (fibroblastes) et paracrine (cellules épithéliales tumorales) de la cytokine LIF (Leukemia Inhibitory Factor), en réponse à une stimulation par le TGFbeta (Tumor Growth Factor-beta). Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires régissant le dialogue entre les FACs, les cellules tumorales et la MEC paraît essentielle pour la mise au point de thérapies anti-tumorales de nouvelle génération. A cet égard, nous nous proposons d'étudier l'influence du microenvironnement tumoral, et plus précisément du rôle des FACs, au cours du développement du carcinome mammaire dans un modèle syngénique et orthotopique de carcinome mammaire chez la souris Balb/C.

Le programme de recherche vise à valider *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro*, qui démontrent que l'inhibition combinée des kinases JAK (Janus Kinase) et des enzymes de modification épigénétique de l'ADN pourrait contrecarrer le potentiel protumorigénique des fibroblastes tumoraux . Il s'agit d'une procédure unique dans laquelle nous co-implanterons (xénogreffes syngéniques) dans la glande mammaire de souris femelles Balb/C, les cellules de carcinomes mammaires 67NR ainsi que des fibroblastes murins dermique activés (ayant subi des prétraitements *in vitro* avec les inhibiteurs choisis, Ruxo et 5'-Azacytidine). Après 30 jours de suivi de croissance tumorale après implantation, les animaux seront sacrifiés et les tumeurs seront prélevées puis analysées par immunohistochimie. Afin de répondre aux reviewers de notre manuscrit en cours de révision , nous proposons 6 groupes de 6 souris chacun (cf détails des lots dans la procédure), et de répéter l'expérience une fois (soit $6 \times 6 = 36 \times 2 = 72$). Ainsi 72 souris Balb/C seront nécessaires à ce projet de recherche.

L'utilisation de cultures organotypiques en trois-dimensions *in vitro*, nous permettant d'aborder la complexité des interactions entre deux types cellulaires, nous permet de réduire considérablement l'utilisation de modèles animaux pour mener à bien nos projets de recherche. Cependant, de nombreux constituants de la tumeur sont encore manquants et seul l'utilisation d'un modèle animal permet de récapituler toute la complexité des interactions multi-cellulaires observées au cours du développement de cette pathologie. De plus, la taille de l'effet (nombre d'animaux nécessaire pour atteindre la significativité sur la base des premiers résultats) a été évalué par tests statistiques prédictifs en utilisant la méthode de simulation de Monte Carlo. Enfin, toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours afin de préserver le bien être de l'animal et de réduire au minimum leur niveau de stress. Ainsi, les animaux seront maintenus dans un environnement enrichi et une fiche d'évaluation du bien être des animaux sera renseignée tout au long la procédure. Cette procédure expérimentale proposée est de classe dite "modérée" Les animaux seront suivis quotidiennement pour surveiller leur état général, leur poids et l'évolution des tumeurs.

Cette étude permettra de comprendre et d'envisager l'identification de molécules actives pour le traitement de l'invasion tumorale collective qui, du fait de l'inefficacité des thérapies actuellement disponibles, demeure la cause essentielle des décès chez les patients souffrant d'un carcinome.

1928- L'intense recherche fondamentale sur les cellules ROR γ t+ et les lymphocytes Th17 en particulier qui a été menée depuis une dizaine d'années permet aujourd'hui d'envisager des avancées thérapeutiques significatives dans de nombreuses maladies autoimmunitaires telles que le psoriasis, la sclérose en plaques ou différents types d'arthrites. Cependant, des résultats décevants et même des conséquences néfastes ont au contraire été reportés dans le contexte des maladies inflammatoires de l'intestin. L'engouement né de ces interventions doit donc être nuancé au regard de la complexité encore mal appréhendée de la biologie des cellules Th17 mais aussi d'autres cellules immunitaires innées ou adaptatives dépendantes du facteur de transcription ROR γ t. Dans ce projet, nous souhaitons déterminer le rôle de nouveaux gènes de fonctions inconnues dans des modèles reconnus de colites inflammatoires chez la souris. Ce travail chez l'animal est incontournable avant d'envisager de nouvelles approches chez l'homme.

Nous souhaitons réaliser des expériences chez la souris de laboratoire C57BL/6. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées que nous avons générées pour annuler l'expression des gènes homologues Tmem176a et Tmem176b (souris double KO : DKO) qui sont fortement exprimés dans les cellules ROR γ t+ ainsi que dans des biopsies de patients atteints de maladies autoinflammatoires de l'intestin (résultats non publiés). Ces souris ne présentent pas de problèmes de développement, d'anomalies particulières ou de pathologies spontanées comparées à des souris sauvages. Nous posons l'hypothèse que ces gènes interviennent dans des processus pathologiques dans le contexte de l'inflammation de l'intestin pour laquelle nos souris DKO pourraient alors être résistantes.

Il est important d'examiner des modèles murins distincts et reconnus pour l'induction d'inflammation intestinale. Les trois modèles, aigus ou chroniques, que nous avons retenus mettent en jeu des processus distincts menant à une inflammation, à différents degrés, de la muqueuse intestinale. L'utilisation de tels modèles animaux est essentielle pour comprendre le rôle de ces deux gènes dans la physiopathologie des maladies inflammatoires de l'intestin et ainsi établir un potentiel intérêt thérapeutique de leur modulation.

Colite par injection d'anti-CD3 : L'injection d'anticorps anti-CD3 provoque une génération importante de cellules Th17 responsables d'une inflammation limitée et rapidement réversible de la muqueuse intestinale. Il s'agit d'un modèle court (4 jours) unique pour l'étude de la différenciation/migration/régulation des cellules T du type Th17 dans un contexte d'inflammation transitoire et contrôlée n'impactant pas significativement les souris.

Colite par DSS (Dextran Sodium Sulfate) : Le DSS est un polysaccharide sulfaté couramment utilisé pour induire des colites inflammatoires chez le rongeur. L'administration de ce composé dans l'eau de boisson provoque une altération de la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale. La flore microbienne est alors en contact avec le système immunitaire muqueux ce qui génère une inflammation perdurant le temps de l'administration du produit mais réversible dès son retrait. Il s'agit donc d'un excellent modèle pour étudier les phénomènes de régénération du tissu intestinal après agression.

Colite par transfert de cellules T : Dans ce modèle de colite chronique, des cellules T CD4+ CD45RBhi sont transférées dans des souris immunodéficientes RAGKO. L'inflammation intestinale se développe progressivement après plusieurs semaines et est associée à une perte de masse. Il s'agit du modèle murin pré-clinique de référence pour l'étude de la colite chronique et est incontournable pour examiner l'impact de nos gènes d'intérêt.

Réduire : Les modèles que nous avons sélectionnés sont largement reconnus dans la littérature scientifique comme étant associés à une incidence de développement inflammatoire forte et synchronisée, ce qui permet l'utilisation d'un nombre restreint de souris par expérience afin d'obtenir une réponse rapide et pertinente. Le nombre de souris que nous prévoyons d'utiliser est 100, tous modèles confondus. Il s'agit cependant d'une estimation très haute puisque les expériences impliquant des analyses biologiques ne seront mises en œuvre que lorsque des expériences initiales de suivi de signes cliniques l'auront justifié.

Raffiner : Nous veillons au bien-être de nos souris en élevage par une inspection régulière (3 à 5 fois par semaine) afin de détecter au plus tôt tout état de stress ou pathologique, surveiller les portées et effectuer les sevrages. L'enrichissement (ajouté sous la forme de tampons de coton) est désormais généralisé, à la fois pour les cages d'accouplement, les souris sevrées et séparées par sexe ou pour les cages d'expérimentation. Nous plaçons un minimum de 2 souris par cage (5 maximum) pour éviter le stress de l'isolement. Lorsque cela sera nécessaire (modèle de transfert de cellules T et modèle DSS), des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux.

Remplace : L'utilisation de tels modèles animaux est pleinement justifiée par l'absence de systèmes in vitro alternatifs permettant d'analyser la complexité des actions des gènes Tmem176a et Tmem176b dans la muqueuse colique.

1929- Les mutations génétiques naturelles peuvent impacter la capacité des individus à survivre ou à se reproduire et sont alors éliminés à plus ou moins long terme par sélection naturelle. Cependant, beaucoup de ces mutations sont récessives et sont transmises de génération en génération puisque celles-ci ne peuvent s'exprimer que lors d'un accouplement à risque entre un mâle et une femelle porteurs de la dite mutation. L'identification et la caractérisation de ces mutations récessives délétères devient une priorité pour la filière bovine afin de mieux connaître la relation entre les changements spontanés survenus sur le génome de l'animal et leurs conséquences physiologiques sur le développement de l'animal. Ces connaissances permettront également d'optimiser le conseil aux éleveurs en matière de gestion des accouplements. Après avoir identifié une liste de mutations récessives délétères candidates par des approches statistiques, huit d'entre elles feront l'objet d'une étude fine en station expérimentale. Le projet présenté dans cette demande consiste à réaliser un suivi fin des premières étapes de développement après mise à la reproduction d'une femelle porteuse de la mutation considérée avec la semence d'un taureau lui-même porteur de la même mutation (accouplement à risque) afin d'apprécier les conséquences physiologiques. Pour chacune des mutations étudiées, 4 femelles seront utilisées soit un total de 32 femelles sur l'ensemble du

projet qui seront conservées dans l'élevage en fin de projet. Le projet présenté répond à la règle des 3R: (1) REMPLACEMENT: compte-tenu de l'objectif même de l'étude qui vise à comprendre les répercussions de mutations génétiques récessives chez les bovins, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude ; (2) REDUCTION: le design expérimental du projet permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés en répétant les procédures expérimentales sur les mêmes individus tout en conservant un minimum de variabilité individuelle; (3) RAFFINEMENT: les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (10m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des applombs, accès à des brosses latérales et dorsales...).

1930- Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est au 6ème rang des cancers les plus fréquents, son pronostic est sombre et la survie est limitée chez la plupart des patients. Des données précliniques et cliniques suggèrent qu'une immunothérapie anti-tumorale pourrait avoir le plus de bénéfices chez des patients ayant une faible charge tumorale, en adjuvant à leur traitement ou bien secondairement au traitement de première ligne, une fois leur maladie stabilisée.

La conversion des informations pré-cliniques aux applications cliniques nécessite des modèles d'animaux aussi pertinents que possible afin de pouvoir faire une transposition aux études pathologiques humaines . L'immunothérapie du CHC a idéalement besoin d'un modèle de tumorigenèse in-situ dans lequel les cellules du foie transformées proviennent d'hépatocytes normaux qui se développent lentement, dans un animal immunocompétent. Un tel modèle imiterait la situation patho-physiologique du patient CHC, avec des nodules tumoraux provenant d'un foie malade, principalement ou à la suite d'un traitement d'ablation en premier.

De nombreux modèles d'hépatocarcinogénèse ont été étudiés chez la souris.

Le modèle pour notre étude devra être conforme aux nouvelles lignes directrices appelé la « règle des 3R ».

Dans un souci de raffinement , notre choix s'est orienté vers des études utilisant un carcinogène appelé le diethylnitrosamine (DEN). Ceci s'explique par la fait qu'il induit au niveau du foie le développement d'hépatocarcinome cellulaire avec une faible propagation tumorale sur d'autres sites comparé à d'autre carcinogène, et une croissance tumorale lente assurant la possibilité aux animaux d'être soumis à une immunothérapie, tout en gardant une faible charge tumorale (microscopique). Notre étude se base sur les données des études antérieures sur ce modèle fournissant des informations sur la progression tumorales et la non-invasion ou dissémination de métastases. Ainsi avec les données des études préliminaires un seuil a été défini tenant compte du développement tumorale afin de préserver le bien être de l'animale ; Celui-ci est fixé à 8 mois.

Dans les modèles tumoraux, les animaux peuvent éprouver de la douleur et/ou détresse justifiant une attention particulière, donc afin de préserver le bien-être des animaux dans la conformité des 3R , des points limites sont définis dans le but de permettre l'interruption de l'expérience le plus précocement possible tout en restant compatibles avec les objectifs scientifiques. L'effet du carcinogène étant effectif à partir du 5ème mois, une surveillance quotidienne des animaux sera mise en place.

Notre modèle DEN s'appuie sur l'ensemble des résultats des différentes études et permet d'étudier des traitements d'immunothérapie anti-tumorale du cancer du foie. La mise en place du modèle nécessite la reproduction de femelles C57Bl6 (14 femelles) et de mâles C3H (7 mâles) afin d'obtenir une lignée B6C3F1. Les souriceaux mâles obtenus seront conservés pour l'induction du CHC. En fonction des naissances obtenues, notre étude comptera 288 animaux. Dans une optique de réduction du nombre d'animaux conforme aux 3R, les animaux reproducteurs sont gardés pour plusieurs reproductions et le nombre de souriceaux par groupe sera de 10/12 individus par condition permettant ainsi un groupe d'animaux réduits mais suffisant pour palier à la variabilité tout en restant un nombre utilisable statistiquement.

Au 8ème mois, les animaux sont euthanasiés, prélèvement de la rate, du sang et le foie qui permettront l'analyse de la surface et la répartition tumorale ainsi que la réponse immunitaire. Afin d'optimiser l'exploitation des résultats et d'éviter la répétition des expériences, les foies des animaux sont conservés afin de pouvoir étudier tous paramètres supplémentaires sans avoir à refaire une expérience. Le modèle présenté sert de base pour l'Etude préclinique de l'efficacité thérapeutique d'une vaccination ADN spécifique d'un antigène tumoral, l'alpha foetoprotéine (AFP).

Ce projet constitue la suite des travaux publiés en 2011, dans lequel nous avons démontré l'efficacité thérapeutique d'un vaccin développé. Il est constitué d'un ADN plasmidique codant pour l'antigène tumoral cible (AFP) combiné à un copolymère amphiphile, ICA614 qui permet, après injection intramusculaire d'induire une réponse immune spécifique et forte.

1931- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie majoritairement impliquée dans les infections broncho-pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. D'abord minoritaire dans l'enfance par rapport à *Staphylococcus aureus*, son incidence croît progressivement durant l'adolescence, pour représenter quasiment 80% des infections à l'âge adulte. Ce pathogène opportuniste se caractérise par des capacités d'adaptation à l'environnement et d'acquisition de résistances aux antibiotiques qui font que les cliniciens se retrouvent régulièrement confrontés à des bactéries multirésistantes vis-à-vis de l'arsenal antibiotique disponible. Cet arsenal n'est d'ailleurs plus alimenté depuis plusieurs décennies par l'apport de nouveaux antibiotiques, du fait d'un relatif désintéressement de l'industrie pharmaceutique pour ce type de médicaments.

La formation de biofilm, colonie structurée de microorganismes entourés par une matrice extra-cellulaire et adhérent à un support vivant ou inerte, constitue l'un des mécanismes de défense de *P. aeruginosa*. Les bactéries sont ainsi protégées des agressions extérieures, les cellules immunitaires et antibiotiques ayant des difficultés à pénétrer et à permettre l'élimination des bactéries. Les thérapies utilisées pour lutter contre les infections sont donc peu ou non efficaces lorsqu'il y a formation de biofilm.

Face à cette situation, l'exploration de nouvelles pistes thérapeutiques est cruciale. Des thérapeutiques pouvant agir en complément des antibiotiques et permettant de limiter la pression de sélection sur les flores microbiennes des patients pourraient ainsi limiter l'apparition de souches résistantes. Le développement de molécules anti-biofilm est à l'heure actuelle une stratégie thérapeutique intéressante et fait l'objet de nombreuses études. Cela concerne principalement des disperseurs de biofilm, des bactériophages et des inhibiteurs de biofilm.

Une équipe française a découvert une molécule ayant des capacités non seulement d'inhibition de l'adhésion bactérienne aux surfaces, mais également d'inhibition de formation de biofilm et d'altération de la viabilité bactérienne intra-biofilm. Il s'agit d'une substance provenant d'une bactérie marine avec un large spectre d'action puisqu'elle est active sur toutes les souches bactériennes marines à Gram négatif.

Des études préliminaires *in vitro* ont montré une action de cette substance sur la formation du biofilm de souches de *P. aeruginosa* isolées à partir d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

Le but de notre travail sera d'évaluer dans un modèle murin de pneumopathie à *P. aeruginosa* le potentiel anti-biofilm de cette nouvelle molécule ainsi que l'impact sur la prévention de l'infection dans le poumon.

Afin de mener à bien cette étude, 456 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit l'infection des poumons aux souris sous anesthésie générale, l'efficacité de la substance sera comparée à un traitement antibiotique administré par voie sous-cutanée. L'association « substance+ antibiotique » sera également testée. Après numération des bactéries survivantes dans les végétations et dans la rate, les résultats obtenus pour les différents groupes seront comparés par un test statistique approprié.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Afin de limiter les sources d'anxiété ou de souffrance, la réalisation du modèle infectieux ainsi que l'euthanasie sont faites sous anesthésie générale. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante dont la litière est changée une fois par semaine et avec accès libre à l'eau et à la nourriture.

Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude en évaluant l'état général des souris deux fois par jour avec analyse des signes généraux (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement) et des points limites seront mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance avec symptômes non réversibles, l'animal sera euthanasié après pré - anesthésie.

1932- Dans un contexte d'accroissement de la population mondiale, d'augmentation du prix des matières premières et de pollution environnementale entraînée par l'élevage, l'efficacité d'utilisation des ressources alimentaires par les ruminants (efficacité alimentaire [EA] ; quantité de produit animal obtenu par unité d'aliment ingérée), son évaluation et son amélioration s'avèrent essentielles pour maintenir la rentabilité de l'éleveur et pour diminuer les impacts environnementaux de l'élevage. Ainsi, une augmentation de la part des fourrages dans les rations des ruminants et une diminution concomitante de l'apport en céréales sont attendues pour faire face aux enjeux mondiaux de la production animale. Optimiser le potentiel des ruminants à valoriser leurs rations, et plus particulièrement les ressources fourragères, est donc une stratégie incontournable pour assurer la durabilité de l'élevage de ruminants.

Dans cet objectif, le programme Beefalim (co-construit entre les UMT Safe et 3G) vise à augmenter l'EA des bovins allaitants, par la voie génétique (sélection des animaux sur des critères d'efficacité), nutritionnelle (stratégie de rationnement pour optimiser l'EA avec des rations riches en fourrages) et l'interaction entre les deux. S'il est bien connu qu'il existe une variabilité individuelle non négligeable dans l'EA des bovins, la contribution respective de l'efficacité digestive vs métabolique à cette variabilité est encore largement méconnue ; par ailleurs, la quantification de l'EA est coûteuse et longue à mettre en oeuvre (contrôle individuel et strict de l'ingestion et des performances sur une période de plus de 2 mois). Il est donc nécessaire de trouver des méthodes alternatives, applicables à grande échelle et dans différents contextes de production (phase, animal et régime) afin de : i) sélectionner les animaux sur des critères d'EA qui soient compatibles avec la rentabilité de la production des bovins, ii) adapter la conduite des bovins à leur potentiel d'utilisation de différents types de rations et iii) diagnostiquer des problèmes d'EA au niveau du troupeau/animal afin de changer le mode de conduite des animaux. Cela implique dans un premier temps de travailler sur des bovins comme modèle animal.

Parmi ces méthodes alternatives, le phénotypage de l'efficacité digestive à partir de prélèvements fécaux analysés par des méthodes de laboratoire et par spectroscopie proche infrarouge (SPIR), constitue, de par sa simplicité de mise en oeuvre, un critère d'EA potentiellement éligible pour une application de terrain.

L'objectif de cette étude est de développer des indicateurs fécaux permettant de phénotyper par des méthodes physiques (SPIR) chimiques ou biologiques de laboratoire (Daisy) la digestibilité individuelle des bovins. L'hypothèse de travail est qu'il est possible de quantifier, au niveau des fèces d'un animal recevant une ration donnée : i) une fraction totalement indigestible caractéristique de la ration ; ii) une fraction potentiellement digestible, inversement reliée à l'efficacité digestive de l'animal.

Seize vaches Charolaises, différant le plus largement possible sur leur EA déterminée au préalable à l'UE de Génétique Animale de Bourges (8 vaches EA+ et 8 vaches EA-) seront utilisées. Les vaches recevront successivement 2 régimes contrastés : un régime « parois » à base de foin ou d'ensilage d'herbe et de concentré pauvre en amidon, et un régime « amidon » à base d'ensilage de maïs et de concentré amylicé. Il s'agit de l'effectif minimal pour apprécier la variabilité individuelle sur la digestibilité et pour développer une calibration SPIR des indicateurs de cette digestibilité. La digestibilité sera mesurée (mesure de référence) et les échantillons fécaux seront utilisés pour développer les indicateurs de digestibilité. Les animaux seront adaptés aux cages de digestibilité et aux régimes pendant 15 jours (le strict minimum nécessaire) afin que les données obtenues la troisième semaine soient valables. Les indicateurs fécaux seront la composition chimique des fèces, leur dégradabilité ruminale mesurée *in sacco* (sur 3 vaches fistulées du rumen) et *in vitro* en laboratoire (incubateurs Daisy). L'utilisation de 3 vaches fistulées du rumen est le minimum nécessaire pour respecter la méthodologie de référence *in sacco* et

analyser statistiquement les données. Les indicateurs les mieux reliés à la digestibilité de référence feront l'objet d'une calibration SPIR pour une application à haut débit.

1933- Les accidents vasculaires cérébraux sont la 1ère cause d'invalidité dans les pays développés. Les études expérimentales ont montré les effets neuroprotecteurs de nombreux agents pharmacologiques. Cependant, du fait d'importants effets secondaires, aucun de ces agents n'a encore démontré son efficacité chez l'homme.

Les gaz rares sont des candidats intéressants en tant qu'agents neuroprotecteurs directs (utilisés pendant l'ischémie) préconditionnants (utilisé brièvement quelques heures avant l'ischémie) et postconditionnant (utilisé après l'ischémie) en particulier en raison de leur excellente tolérance clinique. De récentes données expérimentales suggèrent l'existence d'un effet neuroprotecteur direct de l'argon comparable à celui décrit pour le gaz noble de référence, le Xénon.

Les objectifs de cette recherche seront de confirmer l'existence d'un effet neuroprotecteur du préconditionnement et du postconditionnement par l'Argon et de le comparer à la neuroprotection directe sur un modèle *in vivo* d'ischémie cérébrale transitoire par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) chez le rat.

Afin d'évaluer l'effet neuroprotecteur de l'argon nous utiliserons 48 rats Sprague-Dawley mâles répartis en 4 groupes de 12 rats. Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par Sévoflurane.

Les animaux auront un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau jusqu'au jour de l'intervention. Un délai minimum de 72 heures entre la réception des rats et la date de la chirurgie sera respecté.

L'effet neuroprotecteur sera quantifié à l'aide de tests neurocomportementaux répétés, et d'une détermination du volume cérébral infarci au 14ème jour post-ischémie.

De plus, nous allons bénéficier d'une nouvelle technique d'imagerie utilisant des traceurs radioactifs couplés avec un scanner de grande précision qui nous permet de quantifier la zone qui n'est plus alimentée par du sang et qui est définitivement morte. Elle permet surtout de quantifier les phénomènes délétères mais potentiellement réversibles qui surviennent autour de cette zone et qui sont à l'origine d'une extension de la lésion et *in extenso* du handicap. De plus si cette nouvelle technique d'imagerie s'avère tenir ses promesses, elle permettra de quantifier *in vivo* l'action protectrice des molécules en cours de développement et cela sans avoir à sacrifier les animaux.

Contrairement aux nombreux agents neuroprotecteurs déjà testés et qui ont malheureusement été des échecs (importants effets secondaires), l'argon a fait la preuve de sa grande innocuité chez l'Homme et semble un candidat intéressant en tant qu'agent neuroprotecteur. Ainsi l'hypothèse testée dans ce projet est que l'argon permettrait de limiter les conséquences cliniques d'une ischémie cérébrale focale chez le rat, sur un modèle mimant un accident vasculaire cérébral chez l'homme.

Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par Sévoflurane.

Le modèle d'ischémie-reperfusion par occlusion temporaire de l'artère cérébrale moyenne sans craniectomie sera réalisé sur des rats Sprague-Dawley mâles. Les animaux auront un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau jusqu'au jour de l'intervention. Un délai minimum de 72 heures entre la réception des rats et la date de la chirurgie sera respecté.

L'artère de la queue sera cathétérisée afin de surveiller la pression artérielle moyenne, la glycémie, les gaz du sang à deux moments: avant la chirurgie et lors de la reperfusion.

La température péri-crânienne sera maintenue constante à 37,5°C à l'aide d'une couverture chauffante. De la vitamine A pommade oculaire sera appliquée dans les yeux.

Une analgésie de la cervicotomie sera systématiquement réalisée 20 minutes avant le réveil de l'animal par une infiltration sous cutanée avec un anesthésique local (ropivacaïne 7,5mg/ml) de longue durée d'action (8-12 heures).

L'analgésie post-opératoire sera assurée par anesthésie locale du site opératoire avec de la ropivacaïne 0,2% (durée 12h) et de la Buprenorphine 0,05 mg/kg en injection sous cutanée selon évaluation de la douleur.

1934- La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative se traduisant précocement par des troubles de la mémoire s'aggravant irrémédiablement avec la progression de la maladie. Il est aujourd'hui largement accepté que l'amyloïde beta (Ab) jouerait un rôle-clé dans la physiopathologie de la MA (hypothèse amyloïde). De ce fait, la quasi-totalité des recherches se concentre sur les effets délétères de l'Ab sur le fonctionnement neuronal. Cependant, nous avons récemment montré sur un modèle murin de la MA, que des altérations du fonctionnement cérébral pouvaient être détectées en l'absence d'Ab détectable. Ces modifications du fonctionnement neuronal seraient liées à la présence de b-CTF, le précurseur immédiat de l'Ab. De manière innovante, l'objectif de notre projet est donc de démontrer que, dans la cascade amyloïde, le b-CTF représente le premier élément pathologique, bien avant l'Ab.

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle murin récapitulant en partie les déficits décrits dans la MA, les souris TgCRND8. Nous caractériserons chez ces souris les altérations du fonctionnement cérébral par des approches électrophysiologiques et leurs répercussions sur les capacités cognitives de ces animaux. De plus, nous testerons l'hypothèse selon laquelle le b-CTF est bien responsable des altérations décrites en utilisant des approches pharmacologiques. Afin de définitivement confirmer le rôle du b-CTF dans les troubles cognitifs que nous avons déjà décrits, nous utiliserons un autre modèle murin ayant l'avantage de ne sur-exprimer que notre protéine d'intérêt, les souris Tg-betaCTF99/B6.

Ainsi, notre projet permettra de mieux comprendre les altérations précoces se produisant dans la maladie d'Alzheimer, en ciblant une protéine dont le rôle à jusque-là été largement sous-estimé. A plus long terme, cette étude ouvrira certainement de nouvelles voies de recherches afin de développer de nouvelles médications adaptées aux phases précoces de la maladie.

Un effort tout particulier est fait pour suivre la règle des 3R. Remplacement: Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques couplée à des enregistrements intracérébraux, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Raffinement: Le choix des tests a été

guidé par leur popularité actuelle dans le domaine et le choix de l'espèce par son adaptation naturelle à réaliser le test avec un minimum de stress ainsi que sa pertinence par rapport à la question posée. Réduction: le nombre d'animaux nécessaire a été diminué le plus possible (ce projet prévu sur 5 ans utilisera 218 souris mâles), notamment grâce à la mise en place d'un suivi longitudinal des animaux.

1935- Depuis l'époque de Pasteur, on peut définir 3 générations de vaccins : Les vaccins vivants atténués, inactivés ou tués qui consistent, comme leur nom l'indique, à injecter les pathogènes atténués, inactivés ou tués en vue d'induire une réponse immunitaire permettant à l'organisme de se défendre en cas de contact ultérieur avec le pathogène vivant. Les vaccins sous unitaires qui, plutôt que d'être constitués par les agents pathogènes en entier, sont composés uniquement d'antigènes spécifiques, généralement présents à la surface des pathogènes. Enfin les vaccins géniques qui consistent à introduire directement dans certaines cellules de l'organisme le gène codant l'antigène. L'antigène vaccinal est alors produit localement, sous sa forme native, par l'organisme de l'individu à immuniser et est donc en tout point similaire à l'antigène synthétisé lors d'une infection

Les vaccins géniques représentent donc les vaccins de demain de par leurs nombreux avantages : simplicité de mise en œuvre, peu coûteux, vaccination multi épitopes, chaîne du froid non obligatoire, profil sécuritaire important...Néanmoins, jusqu'à présent, si les premiers essais chez l'homme ont permis de démontrer que les vaccins géniques étaient bien tolérés et sûrs ils ont échoué à montrer l'induction d'une réponse immunitaire efficace. Ils nécessitent, en outre, des quantités d'acides nucléiques très importantes. Pour permettre leur développement, des stratégies d'optimisation ainsi que des adjuvants sont nécessaires, afin d'améliorer la réponse immunitaire tout en continuant à décrypter les mécanismes mis en jeu lors de la vaccination génique.

Des vecteurs (un type d'adjuvant) ont été développés afin d'améliorer de manière très importante le transfert de ces acides nucléiques au sein des cellules tout en diminuant fortement la quantité d'acides nucléiques nécessaires. Certains de ces vecteurs ont déjà démontré leur efficacité, notamment dans le cadre de vaccins à ADN prophylactiques et thérapeutiques. Néanmoins, une nouvelle approche reposant sur l'utilisation d'ARN en lieu et place de l'ADN, est apparue et suscite un intérêt croissant de par son meilleur profil sécuritaire (pas de risque d'intégration génomique) que l'ADN. Cependant, de la même manière que pour l'ADN, ces ARN passent très difficilement la membrane des cellules et des vecteurs sont nécessaires afin d'améliorer leur transport dans le cytoplasme de celles-ci.

Afin de limiter le nombre de test *in vivo*, un premier screening de vecteurs est effectué *in vitro*. Après cette première sélection, l'usage d'un modèle *in vivo* à ce niveau de notre recherche est indispensable afin d'évaluer le comportement de nos vecteurs synthétiques lors d'une injection intramusculaire. En effet, l'influence de l'environnement (organe, sang) *in vivo* tant par sa mécanique que par sa composition peut entraîner des modifications de comportement que l'on ne peut évaluer *in vitro*. L'évaluation des vecteurs sera effectuée dans la même souche de souris, au même âge et même sexe dans le but de pouvoir les comparer entre eux et de ne pas renouveler les contrôles déjà effectués. La mise en place de ce projet répondra à de nombreuses questions avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme. Selon les données antérieures de l'équipe (nombres de vecteurs validés *in vitro*, conditions testées), on peut estimer à 160 le nombre de souris utilisées sur les 5 ans. Enfin, les souris seront hébergées par groupe de 5 dans des cages avec enrichissement sous forme de nid en vue du raffinement.

1936- La microchirurgie vasculaire est une technique chirurgicale utilisant un microscope permettant de réaliser des anastomoses vasculaires entre vaisseaux de très petit calibre (jusqu'à 0.2 mm de diamètre). Son développement a considérablement étendu les possibilités thérapeutiques en chirurgie, plus particulièrement en chirurgie réparatrice. En effet, elle permet la réimplantation de tissus amputés (doigt, orteil, oreille...), et surtout la pratique de lambeaux libres, tissus prélevés aux dépens d'une zone donneuse avec des vaisseaux nourriciers, qui seront transférés et micro anastomosés à des vaisseaux d'une zone receveuse. Malgré de nombreuses améliorations techniques la réalisation de micro-anastomoses vasculaires présente un taux d'échec de 10% par thrombose. Habituellement le modèle d'étude utilisé est le rat, car la dimension de ses vaisseaux approche celles des vaisseaux utilisés chez l'homme. La survenue d'une thrombose est classiquement objectivée à un temps donné soit par sacrifice de l'animal et contrôle visuel du thrombus, soit par une nouvelle chirurgie en effectuant un test de perméabilité sur l'anastomose. L'objectif de ce projet est donc le développement d'un modèle d'étude en temps réel de la thrombose après micro anastomose vasculaire par microscopie de fluorescence chez la souris. Les avantages d'un tel modèle sont:

- une étude dynamique et continue de la thrombose, impossible à réaliser sur les modèles habituellement utilisés puisque la mesure nécessite une exploration chirurgicale voire un sacrifice de l'animal
- une étude de la thrombose à un stade débutant (microscopique) ou partiel, stade particulièrement intéressant puisqu'une évolution vers le thrombus occlusif pourrait éventuellement être évitée, et observée.

Nous souhaitons étudier la thrombose après micro-anastomose durant les 6 premières heures par microscopie intravitale. Les dommages liés avec cette procédure tiendront du fait que les animaux devront subir préparation chirurgicale autorisant la pratique d'une microscopie de fluorescence sur un axe vasculaire. A l'issue de l'expérimentation les animaux seront tous euthanasiés. Ce projet inclut 2 procédures, la première est un gavage qui sera effectué sous anesthésie gazeuse, la deuxième est une procédure invasive sans réveil les souris sont maintenues sous anesthésie tout au long de l'expérience.

Le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude préliminaire sera de 160 souris sur 2 ans.

L'utilisation d'un modèle vivant avec un système hémostatique dont les principes fondamentaux sont proches de l'être humain est nécessaire pour conduire ce projet. Le Modèle murin a cette capacité et présente en outre des vaisseaux dont les dimensions sont relativement similaires aux vaisseaux utilisés habituellement en chirurgie humaine.

1937- L'anévrisme de l'aorte abdominale est une pathologie fréquente caractérisée par une perte du parallélisme des parois artérielles de l'aorte. Cette pathologie est due au remplacement au sein de la matrice de l'artère, de l'élastine par du collagène. De ce fait, la paroi aortique se rigidifie et perd son élasticité, lui conférant donc un plus grand risque de rupture, ce qui conditionne le pronostic de la maladie.

Le traitement actuel des anévrysmes de l'aorte repose sur l'évaluation au scanner de la taille de l'anévrisme, en effet, si celui-ci mesure plus de 50mm de diamètre, il est considéré comme à haut risque de rupture et nécessite donc un traitement chirurgical.

À ce moment-là, deux options thérapeutiques se présentent, soit le traitement chirurgical conventionnel (mise à plat greffe de l'anévrisme grâce à une prothèse), soit le traitement endovasculaire (endoprothèse aortique).

Pour choisir entre ces deux traitements, il faut évaluer la longueur de ce que l'on appelle le collet aortique : il s'agit de la portion d'aorte saine située entre les artères rénales et la naissance de l'anévrisme sous-jacent. Mais on sait que ce critère de taille n'est pas suffisant pour évaluer la qualité biomécanique de ce collet car le scanner ne donne pas de renseignement qualitatif mais uniquement quantitatif sur celui-ci.

Des études dans la littérature ont montré que l'imagerie par Résonance Magnétique permet d'évaluer les propriétés biomécaniques de l'aorte par mesure de l'élasticité aortique, mais aucune étude n'a évalué les paramètres biomécaniques aortiques dans le cadre de la pathologie anévrysmale.

On a montré que la réalisation d'IRM chez la souris est réalisable et permet des mesures fiables sur un modèle d'anévrisme de l'aorte abdominale induit par injection intra aortique d'élastase chez la souris C57Bl/6, mais aucune étude biomécanique n'a été réalisée. Par contre, des équipes ont déjà montré qu'il était possible d'étudier les paramètres biomécaniques de l'aorte saine de souris.

Les animaux seront surveillés attentivement et les mesures appropriées seront prises en cas de souffrance de l'animal. L'analgésie per opératoire sera assurée par le protocole d'anesthésie multimodale, l'analgésie post opératoire consistera en l'utilisation systématique pendant 7 jours d'antalgiques de palier 1, et si nécessaire, en fonction de l'évaluation de la souffrance de l'animal, nous mettrons en place un antalgique de palier 2. L'analgésie post opératoire consistera en l'injection sous cutanée quotidienne pendant 5 jours de Paracétamol.

L'objectif principal de notre étude est donc d'étudier les paramètres biomécaniques de l'aorte abdominale de souris C57Bl/6 dans le cadre d'un modèle d'anévrisme à l'élastase chez 66 souris en respectant la règle des 3R.

1938- Au cours du développement embryonnaire et fœtal, certains gènes sont nécessaires à la formation des organes. Ainsi, le gène PDX1 est nécessaire à la formation du pancréas. Chez la souris, l'inactivation du gène PDX1 (knock out ou KO) entraîne l'absence de pancréas chez les animaux qui naissent PDX1^{-/-} (KO des deux copies de PDX1) alors que les animaux PDX1^{+/-} (KO d'une seule copie) sont normaux. Toutefois, si des embryons PDX1^{-/-} sont complétés avec des cellules souches PDX1^{+/+}, les animaux naissent avec un pancréas normal. Si des embryons PDX1^{-/-} de souris sont injectés avec des cellules souches de rat, les souriceaux naissent avec un pancréas exclusivement constitué de cellules de rat. Cette observation paraît intéressante en vue de produire du tissu pancréatique d'une espèce dans des animaux d'une autre espèce. Un KO de PDX1 a été généré précédemment chez le porc par délétion ciblée de 35 bases du gène, conduisant à son inactivation totale. L'objectif de ce projet est de vérifier la fonction de PDX1 chez le porc en soumettant les animaux mutés et non mutés à un test d'élimination de glucose injecté (challenge glucose) et de proposer un modèle d'étude en vue de la production chez le porc de tissu pancréatique d'une autre espèce. En attendant ces éventuelles études futures, la lignée mutée sera conservée dans l'azote (semence du fondateur et des mâles de la F1), une fois le rôle de PDX1 établi. Nous avons cherché à REDUIRE le nombre d'animaux utilisés en challenge glucose, conformément aux nombres couramment cités dans la littérature pour ce genre de test (deux groupes de 6 animaux utilisés pour le challenge, quatre femelles pour générer ces animaux et de 12 à 28 animaux non utilisés, surnuméraires ou de génotype non utilisé, soit un total de 12 animaux utilisés sur 28 à 44 animaux de la lignée, selon les résultats de reproduction). La procédure est peu douloureuse et sera RAFFINEE car les animaux seront équipés d'un cathéter afin d'éviter les piqûres répétées pour les prises de sang sériées suivant l'injection de glucose. Les animaux seront euthanasiés suite à la dernière prise de sang par injection létale d'anesthésique afin de peser les organes (foie, rate et pancréas) et de fixer un fragment de pancréas. Tous les autres animaux de cette lignée seront également euthanasiés à la suite de l'expérience (femelles F1 et animaux excédentaires F2). Il n'est pas possible de REMPLACER l'utilisation de porcs dans cette expérimentation puisque c'est dans cette espèce que nous souhaitons comprendre le rôle du gène et que c'est cette espèce qui paraît intéressante pour la production de tissu pancréatique (taille, physiologie,...).

1939- La sécheresse oculaire (ou syndrome de l'œil sec) fait partie des maladies ophtalmiques les plus répandues. Les symptômes oculaires sont très variables, allant d'une gêne à une irritation sévère avec des douleurs oculaires. La sécheresse oculaire est une pathologie affectant environ 15% des personnes âgées de plus de 65 ans. Sa fréquence augmente chez le sujet âgé, chez la femme après la ménopause et l'homme après l'andropause et en cas de maladie auto-immune. La plus grande étude épidémiologique a conclu qu'aux États Unis environ 3,23 millions de femmes et 1,68 millions d'hommes de plus de 50 ans sont atteints du syndrome de l'œil sec.

La sécheresse oculaire est habituellement liée à un défaut de sécrétion de mucus, même si une déshydratation anormale de ce mucus peut également être présente. La sécheresse oculaire peut également avoir pour origine une prise médicamenteuse (antidépresseurs, anxiolytiques, neuroleptiques, anti-épileptiques, anti-parkinsoniens et morphiniques), un traitement hormonal ou encore certaines chimiothérapies. La sécheresse oculaire peut aussi résulter d'une atteinte du film de mucus dans les cas d'inflammation chroniques de la conjonctive (allergie, syndrome de Stevens-Johnson, brûlures) ou encore faire suite à des agressions aiguës de la surface oculaire (chirurgie de la cataracte, conjonctivite infectieuse ou allergique). Enfin, les lentilles de contact, l'environnement (polluants, produits ménagers), l'utilisation intensive des écrans (informatique, jeux...) et la carence en vitamine A peuvent aussi être à l'origine de sécheresses oculaires. La sécheresse oculaire se traduit par un défaut de mucus produit par les cellules caliciformes de l'épithélium de la conjonctive. La diminution du nombre de cellules à mucus est un événement précoce dans la maladie. Ce mucus est une substance visco-élastique hétérogène très complexe dont les propriétés sont dictées essentiellement par les mucines gélifiantes, de volumineuses molécules hydrophiles. Ce mucus assure un rôle d'hydratation de l'œil et piège les particules, poussières, micro-organismes (bactéries, virus) qui sont alors éliminés.

Les deux mucines codées par les gènes MUC5B et MUC5AC sont les mucines gélifiantes majeures de la surface oculaire chez l'Homme et la souris. Leur expression semble diminuer dans le syndrome de l'œil sec par une perte des cellules à mucus et probablement une diminution d'expression (niveau transcriptionnel) dans les cellules à mucus.

Les traitements du syndrome de l'œil sec sont nombreux à cause des origines multi-factorielles et des différentes formes de la maladie. Les agents pharmacologiques restent à ce jour le traitement de choix à long terme mais impliquent des effets secondaires. Une meilleure compréhension du développement et de la progression de la maladie, ainsi que la disposition d'un modèle intégré permettant de suivre la production de mucines sont des pré-requis pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques en développement qui stimulent la production de mucines gélifiantes.

Le but de ce protocole est d'étudier l'expression oculaire de la mucine gélifiante Muc5b modifiée génétiquement chez la souris et de montrer la diminution de la production de la mucine dans un modèle de syndrome de l'œil sec chez la souris et la stimulation de la production de mucus (ou de la stimulation de la différenciation cellulaire en cellules à mucus) par des agents pharmacologiques. Le nombre de souris nécessaires pour chaque protocole est minimisé par l'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifiée. L'étude de l'expression en situation normale nécessitera 10 souris, la mise au point d'un modèle de syndrome de l'œil sec nécessitera 27 souris, l'étude de chaque traitement pharmacologique pourrait nécessiter 11 souris sans syndrome d'œil sec, et 30 souris supplémentaires si nécessité d'induire un syndrome d'œil sec. Le protocole devrait nécessiter 78 souris.

Le modèle d'induction de sécheresse oculaire induit une légère gêne pour l'animal qui peut se gratter l'œil. Les protocoles utilisant les 2 yeux permettent des analyses statistiques appariées. Le protocole d'induction de BAK nécessite une manipulation bi-quotidienne des animaux assurant un suivi du bien être des souris. L'administration des SEC qui seront testés ne doit pas induire de gêne particulière ou souffrance. Les animaux seront manipulés quotidiennement. Toute souris montrant des signes de douleurs (prostration, poil hérissé, blessure, perte de masse corporelle >15%) sera sacrifiée par dislocation cervicale.

1940- Les carcinomes nasopharyngés ou NPC sont des tumeurs situées à la partie la plus haute des voies respiratoires. Ils représentent un problème majeur de santé publique dans de nombreux pays d'Asie et d'Afrique. Leur fréquence tend à augmenter dans les pays d'Europe du fait de l'importance des flux migratoires.

On sait qu'un virus appelé virus d'Epstein-Barr (EBV) est impliqué dans le développement de cette tumeur. Cependant les mécanismes de cancérogénèse demeurent très mal connus dans cette maladie et les progrès thérapeutiques demeurent très lents. Ce retard à l'innovation est lié en grande partie à l'absence de ressources biologiques appropriées. En effet, les biopsies tumorales sont difficiles à réaliser souvent douloureuses et hémorragiques. Les fragments de tissu collectés pour le diagnostic sont donc de très petite taille, peu propices aux investigations au niveau cellulaire et moléculaire. A l'heure actuelle, en dépit d'innombrables tentatives, il n'existe qu'une seule lignée de NPC vraiment représentative qui puisse être propagée in vitro. Les seules autres ressources biologiques sont des lignées tumorales de NPC établies par xénogreffe sur souris nude, à partir de prélèvements provenant directement des malades (on parle de PDX « Patient Derived xenografts »). Ces lignées PDX ont été obtenues dans notre établissement grâce à une collaboration exemplaire entre cliniciens et chercheurs, après beaucoup de tentatives infructueuses. Elles représentent une ressource biologique extrêmement précieuse. Elles sont demandées chaque année par un nombre croissant de laboratoires publics ou privés, dans de nombreux pays du monde. Ces lignées sont réellement irremplaçables, mondialement, malgré de nombreux essais ailleurs dans le monde, en particulier en Asie (zone particulièrement concernée par cette pathologie).

Ce projet a pour objectif de poursuivre la propagation sur souris nude de nos lignées PDX. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de les conserver par des méthodes autres que celle-ci. Néanmoins, en dépit des difficultés rencontrées, la recherche de procédures de remplacement se poursuit. Nous continuons à faire des tentatives de culture in vitro pour les cellules de NPC tandis que des collègues chinois tentent la transplantation sur œuf de poule embryonné. En termes de réduction, nous cherchons à tirer parti d'une meilleure connaissance des paramètres de croissance de chaque lignée tumorale. Il faut éviter à la fois les échecs de transplantation et les croissances trop rapides. Cela permet d'utiliser un nombre minimal d'animaux. En termes de raffinement, nous utilisons systématiquement une anesthésie générale pour la réalisation de la greffe et nous positionnons le greffon de manière à produire le minimum d'inconfort. Les autres mesures pour diminuer la souffrance liée au portage tumoral sont la surveillance très régulière du poids de l'animal, du volume tumoral et de l'état cutané et l'interruption de la procédure dès que les point-limites sont atteints.

Nous prévoyons 405 animaux de l'espèce murine pour la totalité de ce projet.

1941- L'hépatite delta est la forme la moins fréquente des hépatites virales chroniques mais une des plus sévères. Le pathogène responsable est le virus de l'hépatite D (HDV), un virus défectif qui nécessite la présence simultanée d'une infection par le virus de l'hépatite B (HBV) pour sa propagation. Même si la prévalence du HDV avait diminué dans les pays occidentaux au début des années 1990, suite à l'introduction de la vaccination contre le HBV et à d'autres mesures de prévention, on observe depuis plusieurs années une recrudescence des hépatites liées au HDV. Le HDV est un virus à ARN, et il s'agit d'un agent défectif dont la réplication a lieu indépendamment du HBV mais qui nécessite néanmoins l'expression des protéines d'enveloppe du HBV pour l'assemblage des virions HDV nécessaires à la propagation. Une infection par le HDV est donc observée uniquement chez les individus qui sont simultanément infectés par le HBV. On estime que globalement 5 à 10% des porteurs du HBV sont co-infectés par le HDV ; c'est-à-dire 15-20 millions de personnes dans le monde.

Il existe deux types d'infection par HDV: 1) la co-infection, au cours de laquelle le HBV et le HDV sont transmis conjointement, et 2) la surinfection, lorsqu'un porteur du HBV est infecté par le HDV. Dans les deux cas, l'hépatite aiguë peut évoluer de manière sévère, voire fulminante. Si l'élimination spontanée des deux virus est la règle chez l'adulte après coinfection HBV-HDV, la surinfection HDV évolue en infection chronique dans environ 90% des cas. Puisque c'est le HDV qui domine habituellement dans cette situation, on parle d'une hépatite D chronique. L'hépatite D chronique est souvent associée à une progression fréquente et rapide vers la cirrhose hépatique et un risque accru de développement de carcinome hépatocellulaire (CHC). Il n'est donc pas rare de trouver une cirrhose hépatique, voire un CHC, chez des patients âgés de 20-30 ans qui ont été infectés durant la petite enfance. Il existe néanmoins des patients dont l'évolution est plus favorable. Les options thérapeutiques pour l'hépatite D chronique restent malheureusement limitées et des aspects importants de la virologie moléculaire, de la pathogenèse et de l'histoire naturelle de ce virus sont encore inconnus. Les études dans les modèles in vitro d'infection par HBV et HDV de lignées d'hépatocarcinome ou d'hépatocytes en culture primaires sont limitées et ne permettent pas de valider les molécules antivirales candidates en termes de métabolisme et pharmacologie, ni de caractériser et comprendre les infections / pathogenèse dans un contexte plus élaboré faisant intervenir des paramètres indispensables tels que la structure de l'organe foie, le métabolisme, le système immunitaire entre autres.

Un modèle de souris, dites chimériques, a été développé récemment, dont le foie est constitué d'hépatocytes murins et humains. Ces souris peuvent être infectées par les virus humains hépatotropes, HDV et HBV notamment. Ce modèle peut fournir un support intéressant pour mieux comprendre les coinfections HDV / HDV et tester de nouvelles molécules antivirales. En terme de retombées scientifiques, ce projet, qui repose sur la mise en place d'une plateforme de souris humanisées pour le foie, permettra de répondre à un besoin urgent des académiques et partenaires industriels dans la recherche fondamentale et translationnelle sur les maladies infectieuses ciblant le foie. Les souris sont immunodéficientes (dépourvues de système immunitaire), ce qui permet la xénogreffe de cellules humaines et sont déficientes en une enzyme hépatique. Cette déficience hépatique permet de créer une pression de sélection nécessaire pour la prise de greffe par les cellules humaines (le foie est un organe régénératif, mais sans pression de sélection, les cellules restent quiescentes). La mise à disposition au sein d'une plateforme de souris humanisées d'un tel modèle permet de mutualiser les recherches en offrant aux différents laboratoires un modèle in vivo de pointe. Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans chaque projet suivra l'esprit de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans les protocoles a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris (définition précise des points limites, administration de médicaments pour supprimer la douleur si nécessaire, choix des méthodes d'injections les moins invasives etc...). Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 4546 souris. Ce projet couvrira les besoins expérimentaux d'au moins 4 équipes travaillant actuellement sur différents aspects des coinfections HBV/HDV, histoire naturelle, virologie fondamentale, réponse immune et test de molécules thérapeutiques.

1942- Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. Ces pathologies sont toutes liées à l'apparition d'une atrophie cérébrale massive et à des atteintes cérébrales telles qu'une perte de l'intégrité fonctionnelle des réseaux neuronaux. En particulier, il n'existe aucun traitement efficace contre la maladie d'Alzheimer (MA), qui est la forme la plus fréquente de démence chez l'Homme. Ses coûts sociétaux sont gigantesques et estimés à plus de 1% du PIB mondial. La compréhension des mécanismes associés à l'atrophie cérébrale et aux atteintes cérébrales liées à l'âge, et le développement de nouveaux traitements, est donc très importante pour permettre une meilleure prise en charge des patients.

L'un des phénomènes qui contribue aux symptômes de certaines maladies neurodégénératives dont la MA est l'inflammation. L'activité du mastocyte, une cellule du système immunitaire, serait un des facteurs majeurs dans les processus inflammatoires de ces maladies. L'activité des mastocytes est réduite par un médicament, masitinib (© AB Science). Depuis 2008, ce médicament est utilisé chez l'Homme dans de nombreuses applications allant d'applications en oncologie jusqu'à des applications des maladies du système nerveux central (sclérose en plaque, sclérose latérale amyotrophique, etc...)

Des données récentes d'un essai clinique ont montré que ce produit peut ralentir l'apparition des symptômes de la MA chez les patients traités. Mais il reste à déterminer si masitinib empêche le développement de la MA en ciblant les mastocytes, ou si son mécanisme d'action est indirect. Le présent projet a pour but d'étudier de façon plus précise et systématique le rôle des mastocytes et des nouvelles voies d'action du masitinib dans des études précliniques réalisées sur des animaux modèles de la MA.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun modèle in vitro ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité cyto-architecturale du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ses cellules.

Le projet prévoit le recours à 300 rongeurs nés et élevés dans des élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre les résultats. Les animaux anesthésiés vont être suivis par imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) sur un mode longitudinal, méthode d'analyse non invasive, avant et après traitement par voie orale. Des protocoles d'analgésie, validés par une équipe de vétérinaire peuvent être mis en place si l'état de l'animal le nécessite. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

1943- La myopathie myotubulaire (XLMTM) est une maladie congénitale très sévère des muscles. Elle est due à des mutations dans le gène *Mtm1* qui code pour une protéine ubiquitaire, la myotubularine. Cette pathologie, dont l'incidence est de 1/50 000 dans la population masculine, n'a aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès au cours de la première année de vie.

Notre projet vise à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la XLMTM. Trois approches seront testées : le remplacement du gène muté par une version normale du gène; la compensation par un gène de la même famille; et la compensation par correction de certains effets secondaires.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle *in vitro* capable de reproduire avec fidélité le phénotype de la myopathie myotubulaire (pas de remplacement possible). Effectivement, bien qu'un modèle cellulaire présentant un phénotype quantifiable (défaut de prolifération et augmentation de la mort cellulaire) ait été décrit, il ne permet pas d'étudier les défauts majeurs observés dans la maladie, notamment les problèmes de dysfonctionnement du couplage excitation nerveuse-contraction musculaire ou la perte de force musculaire. A l'opposé, les modèles murins reproduisent avec fidélité l'ensemble des aspects cellulaires et phénotypiques (faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie).

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes).

Les souris malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès.

Deux lignées murines seront utilisées dans nos études : toutes deux présentent une absence de myotubularine dans tous les tissus de l'organisme, mais leur fond génétique est différent. Tous les traitements seront testés sur le modèle qui présente le phénotype le plus sévère. Le second modèle sera utilisé dans une étude qui vise à comparer l'efficacité thérapeutique d'un traitement en fonction du fond génétique.

Les gènes thérapeutiques apportés n'ont pas montré d'effets néfastes dans des études précédentes et ne devraient pas entraîner une réponse immunitaire. On ne devrait donc pas créer de dommages supplémentaires aux souris modèles, mais amener au contraire à une importante correction de la maladie.

Ce projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation de 1172 souris.

1944- Un des enjeux de la pharmacopée est de découvrir de nouvelles molécules ou des propriétés insoupçonnées de molécules connues, destinées à soigner l'être humain ou l'animal. Les produits naturels, de par leur incroyable diversité moléculaire, sont des outils pharmacologiques essentiels pour la recherche fondamentale et représentent un réservoir unique de molécules aux vertus potentiellement thérapeutiques. Il n'est donc pas étonnant qu'ils soient à l'origine de plus de 50% des médicaments. Parmi ces produits naturels, les imines cycliques (toxines de micro-algues marines), les venins d'animaux (mollusques, scorpions, serpents, araignées...) et les toxines botuliques (toxines bactériennes) représentent une source originale et, pour certains d'entre eux émergente, de composés bioactifs potentiellement retrouvés dans les médicaments.

Ce projet vise à évaluer, *in vivo*, les mécanismes d'action de certains de ces composés bioactifs sur les propriétés d'excitabilité du système neuromusculaire par des méthodes d'électrophysiologie. Le système neuromusculaire, dans un modèle de rongeur sous anesthésie générale, est une cible pour étudier les effets et les mécanismes d'action de ces composés, mais aussi appréhender les risques potentiels sur les humains. En outre, en raison de leur spécificité d'action, certains de ces composés pourront servir d'outils pour concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le recours à l'animal est ici indispensable car aucun modèle *in vitro* ou *in silico* ne peut aujourd'hui reproduire la complexité du comportement physiologique du système neuromusculaire des mammifères. Le rongeur, de par les similitudes fortes de son système neuromusculaire avec l'Homme, est un modèle permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme.

Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 450 rongeurs spécialement élevés à cette fin et provenant d'élevages agréés par des autorités compétentes. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance aux animaux lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, permettront de garantir leurs conditions de vie. Leur état de santé sera surveillé tout au long du projet, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

1945- Les hormones glucocorticoïdes et leurs analogues synthétiques sont largement utilisés chez les patients atteints de maladies inflammatoires et immunitaires telles que l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies auto-immunes. On estime qu'à chaque instant, environ 1% de la population générale et 3% des personnes âgées de plus de 70 ans reçoivent un

traitement par corticoïdes. Cependant, ils présentent de nombreux effets indésirables limitant leur utilisation au long cours tels que prise de poids, dyslipidémie, hypertension artérielle, intolérance au glucose associée à un diabète cortico-induit. De même, les similitudes entre le syndrome métabolique (observé le plus souvent dans l'obésité commune) et les effets indésirables imputables à une corticothérapie suggèrent que les glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'insulino-résistance associée à l'obésité commune.

Notre projet vise à caractériser les impacts des glucocorticoïdes sur des organes clés du métabolisme du glucose tels que le foie responsable principal de la production endogène et du stockage du glucose, le muscle consommateur de grandes quantités de glucose et le pancréas qui produit la seule hormone hypoglycémisante, l'insuline. Bien que la plupart de travaux démontrent un effet néfaste sur le pancréas, certaines études montrent que les corticoïdes pourraient augmenter le nombre d'îlots pancréatiques et induiraient une hypersécrétion d'insuline. Les auteurs suggèrent que cet effet pourrait être dû à une étape de compensation en réponse de l'insulino-résistance afin de maintenir une glycémie normale. La fonction adaptative insulino-sécrétrice du pancréas en réponse à l'effet hyperglycémiant joue un rôle primordial dans le métabolisme du glucose et dans le développement du diabète lors du traitement au glucocorticoïde.

Nous avons précédemment exploré l'homéostasie glucidique chez un modèle murin traité au glucocorticoïde à forte dose à long terme et mis en évidence une hypersécrétion d'insuline due à une prolifération et à une néogenèse de cellule β pancréatique. Nous souhaitons à présent étudier l'effet des glucocorticoïdes sur la néoglucogénèse hépatique.

Ce travail permettra de mieux comprendre les mécanismes des effets métaboliques des patients traités par glucocorticoïdes, mais aussi de façon plus large d'apporter un nouvel éclairage sur l'implication des glucocorticoïdes endogènes dans l'obésité. Vu l'impact des glucocorticoïdes sur de nombreux organes, cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen. Elle utilisera le minimum de souris nécessaires (20 souris C57BL6/J divisées en deux groupes témoin et traité) et respectera le plus possible le bien-être animal (raffinement des procédures et amélioration de leur environnement).

1946- Ce projet à vocation pédagogique s'inscrit dans le cadre de travaux pratiques. il s'agit de mettre en évidence le rôle joué par les glandes surrénales (qui sécrètent notamment aldostérone, corticostérone, catécholamines...) dans l'équilibre hydrominéral, c'est-à-dire l'état d'hydratation de l'organisme et la teneur en sels minéraux (sodium et potassium), et également dans le contrôle du métabolisme du glucose à l'état nourri et à l'état à jeun. En effet le jeûne est un stress métabolique qui entraîne une adaptation de plusieurs organes afin de converger vers le maintien du taux de glucose sanguin, le glucose étant crucial pour le fonctionnement des neurones, toute baisse de la glycémie (<35 mg/dl) peut conduire à la perte de conscience, au coma puis à la mort.

Ainsi les étudiants, qui fonctionnent en binôme, auront à effectuer des prélèvements sur un rat normal : « témoin nourri », qui leur permettra d'obtenir des valeurs de référence pour la glycémie, l'hématocrite (pourcentage de cellules/sang total, reflet de l'état d'hydratation), les concentrations en sodium et potassium sanguin, la concentration en acides gras libres plasmatiques... Ils réaliseront également des mesures sur des échantillons de foie, afin de déterminer « la réserve de glycogène », c'est-à-dire la forme de stockage du glucose, et l'activité d'une enzyme, la tyrosine amino-transférase, qui reflète la formation de glucose de novo ou néoglucogénèse.

Chaque binôme aura également un rat dit « expérimental » : témoin à jeun, surrénalectomisé nourri, surrénalectomisé à jeun, surrénalectomisé à jeun + dexaméthasone (dans ce dernier groupe, la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, est supposé pallier en partie l'absence de glande surrénale). Les étudiants pourront donc apprécier l'effet métabolique du jeûne, de la surrénalectomie, et de l'association de ces deux paramètres, et analyser si leurs résultats sont cohérents avec leurs connaissances sur le métabolisme glucidique et les hormones sécrétées par les glandes surrénales (aldostérone, corticostérone, catécholamines...)

Afin de permettre une conclusion générale avec un nombre d'animal suffisant par groupe, les étudiants ont une séance d'analyse des résultats le mercredi suivant leur TP, les deux salles de TP sont alors fusionnées, ainsi que les résultats obtenus.

6 séances de TP sont prévues, pour 6 groupes d'étudiants (en général il y a 2 séances par semaine pendant 3 semaines)

Pour 2 groupes d'étudiants un total de 30 rats est utilisé pour 2 salles, soit par année universitaire : 90 rats, et pour 5 ans : 450 rats.

- 6 rats témoins

- 6 rats expérimentaux à jeun 36h avant le TP

- 6 rats surrénalectomisés (5 jrs avant le TP + boisson NaCl) à jeun et remis à l'eau (36h avant le TP)

- 6 rats surrénalectomisés (5 jrs avant le TP+ boisson NaCl) nourris et remis à l'eau (36h avant le TP)

- 6 rats surrénalectomisés (5 jrs avant le TP + boisson NaCl) à jeun et remis à l'eau (36h avant le TP) + injection de dexaméthasone (1 fois pendant 2 jours précédant le TP une dose de 0.5ml)

Une attention particulière est portée à la règle des 3R tout au long de l'étude, ainsi la surveillance journalière des animaux en post-opératoire permet de dépister tout mal-être ou souffrance. Concernant l'engagement de réduire le nombre d'animaux, il a été décidé que 2 binômes d'étudiants se partagent l'animal témoin (dont les paramètres biologiques sont connus et peu fluctuants, contrairement aux animaux expérimentaux, dont 1 est fourni par binôme), soit 3 rats pour 4 étudiants.

1947- Le cortex cérébral est le siège des fonctions cognitives supérieures des mammifères. Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes contrôlant la formation des réseaux de neurones dans le cortex au cours du développement embryonnaire, et permettra une meilleure compréhension de perturbations à l'origine de maladies neuro-développementales telles que les troubles de l'autisme, l'épilepsie ou certaines formes de retard mental.

Notre étude portera sur l'étude de deux gènes contrôlant le développement des axones au cours du développement du cortex chez l'embryon. Sur la base de résultats précédents, nous développerons un projet de recherche qui testera comment ces deux gènes interviennent dans l'utilisation du glucose par les neurones. Afin de tester l'importance de cette fonction sur le développement du cerveau chez l'embryon, nous utiliserons des méthodes génétiques largement utilisées chez la souris telles que l'inactivation de ces gènes par knockout, l'expression de molécules fluorescentes et des analyses histologiques.

Notre étude sera conduite chez la souris, car l'architecture du cortex de la souris est proche de l'architecture du cortex humain, et des tests de standardisés de comportement permettent de modéliser les fonctions cognitives telles que la mémoire ou le comportement social et qui sont perturbées dans les maladies neuro-développementales.

Notre projet est divisé en 4 procédures et se déroulera sur 5 ans. Nous estimons que notre projet mobilisera sur cette période un total de 832 souris, comprenant les animaux reproducteurs permettant le maintien de la colonie de souris.

Le recours à un modèle animal est une nécessité car les différentes étapes du développement des neurones dépendent de l'architecture tissulaire du cerveau. Néanmoins à chaque fois que cela sera possible, nous opterons pour des approches *in vitro* afin de remplacer les animaux par des lignées cellulaires. Par ailleurs, nous mettrons en œuvre des stratégies pour réduire le nombre d'animaux nécessaires, telles que l'analyse statistique au préalable à toute expérimentation (tests de puissance), ou la réalisation de plusieurs tests en parallèles à partir des mêmes échantillons prélevés. Enfin, nous chercherons à raffiner nos protocoles, notamment par l'enrichissement de l'environnement des animaux et le recours systématique aux techniques d'analgésie et d'anesthésie pour toute manipulation susceptible d'entraîner du stress ou de la douleur chez l'animal.

1948- L'objectif de ce projet sera de tester l'hypothèse de l'existence de synergies entre légumineuses contenant différents composés bioactifs pour améliorer la conservation des plantes sous forme d'ensilages et l'efficacité d'utilisation de l'azote alimentaire par les animaux, et pour réduire les émissions de méthane entérique et améliorer la qualité de la viande. L'objet d'étude est l'animal et la finalité est de mieux concilier la productivité et la réduction de l'empreinte environnementale de l'élevage, d'où la nécessité d'utiliser des animaux d'élevage pour ce projet, en l'occurrence des ovins.

Les réponses animales seront analysées chez les ovins adultes et les agneaux en croissance au cours de deux procédures expérimentales simultanées visant d'une part à comprendre les mécanismes d'action des composés bioactifs sur les processus digestifs et métaboliques, et d'autre part à mesurer les performances zootechniques et la qualité de la viande:

i) Au cours de la procédure 1, deux lots de cinq jeunes moutons de race Texel seront utilisés dans un dispositif expérimental en carré latin 5x5 répété deux fois. Les animaux d'un de ces deux lots seront équipés d'une canule du rumen pour étudier de manière fine les mécanismes digestifs. Deux animaux de secours seront également prévus.

ii) Au cours de la procédure 2, cinq lots de huit jeunes agneaux de race Romane seront constitués pour mesurer précisément les quantités ingérées et les mettre en relation avec les mesures de gain de poids corporel et la qualité de la viande. L'effectif au sein de chaque lot est nécessaire pour optimiser la puissance des tests statistiques.

Au total, 52 animaux seront utilisés.

Une troisième procédure relative à la pose de canule ruminale est également détaillée.

Ces deux expérimentations ont été optimisées dans le but d'acquérir un nombre important de données qui serviront à différents utilisateurs dans différents domaines de recherche (digestion, réduction du méthane entérique, zootechnie, qualité des produits animaux), donnant à ce projet un caractère pluridisciplinaire.

L'ensemble de ce projet a été construit dans le respect de la règle des 3R, notamment en réduisant le nombre d'animaux grâce au dispositif en carré latin, canulés (1 lot sur 2), en remplaçant un lot d'animaux canulés par un lot non canulé et en raffinant les conditions d'hébergement en box individuel constituant une source de stress pour les animaux. Un aménagement spécifique des box permettra que les animaux puissent avoir des contacts visuel, auditif et olfactif entre eux.

1949- Les cortex moteur et visuel jouent un rôle majeur dans l'apprentissage et la coordination des mouvements volontaires. Toutefois, les mécanismes permettant le contrôle cortical des mouvements sont encore mal connus. Le cortex moteur notamment semble être organisé en nombreux réseaux entrelacés avec de grandes superpositions fonctionnelles (ainsi des neurones impliqués dans des tâches motrices différents peuvent se superposer dans une même zone). Cette superposition rend l'étude des neurones du cortex moteur difficile par des méthodes classique d'électrophysiologie.

Une méthode d'imagerie optique (microscopie 2-photons *in vivo*) qui permet l'observation de l'activité neuronale dans le cerveau d'animaux éveillés et réalisant des tâches motrices a récemment été développée et utilisée en routine chez la souris. Elle permet d'étudier des circuits neuronaux fonctionnels complexes et notamment de suivre l'activité et l'évolution d'une population de neurones pendant plusieurs semaines au cours desquels l'animal apprend une tâche motrice.

L'organisation des réseaux neuronaux corticaux chez le Microcèbe (*Microcebus murinus*) est inconnue. L'utilisation grandissante en neuroscience de ce modèle animal émergent justifie la nécessité de mieux caractériser l'organisation fonctionnelle de son système nerveux central. Il est particulièrement pertinent de comprendre si chez cette espèce, située à mi-distance entre les rongeurs et les hominidés en terme phylogénétique, les cortex moteur et visuel ont une organisation typique des primates ou plus caractéristiques des rongeurs. Ces expériences ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives puisqu'elles nécessitent l'étude de l'activité cérébrale concomitamment avec une l'exécution d'une tâche motrice ou visuelle.

Dans ce projet, nous utiliserons l'imagerie 2-photons *in vivo* au niveau des cortex moteur et visuel en association avec des tâches d'apprentissages (tâche de préhension). Pendant que l'animal apprendra à atteindre, toucher et/ou attraper un objet, nous enregistrerons l'activité de certaines régions des cortex moteur et visuel. L'expérience acquise chez les souris a conduit à

un raffinement expérimental qui permet d'éviter la souffrance, notamment grâce à la maîtrise de la sédation et de l'utilisation de traitements antidouleur et anti-inflammatoire. Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux, ces expériences seront réalisées sur un nombre maximal de 10 animaux. Cette étude nous permettra notamment de déterminer l'organisation des réseaux neuronaux responsables des mouvements volontaires et quels réarrangements rapides de ces réseaux permettent l'apprentissage de nouvelles capacités motrices.

1950- La grippe est une maladie virale fréquente et contagieuse causée par plusieurs virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. Elle est responsable d'épidémies saisonnières (propagation rapide d'une maladie infectieuse) et, plus rarement, de pandémies plus meurtrières (épidémie qui s'étend sur une large zone : parfois la planète).

Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, de développer un modèle d'infection par le virus de la grippe mimant le syndrome grippal humain et, dans un second temps, d'évaluer l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins ». Le but est d'identifier des vaccins plus efficaces contre un grand nombre de souches virales différentes, incluant notamment le virus H1N1 responsable de la pandémie grippale de 2009. Les retombées de cette étude auront des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme pour combattre les souches virales circulant actuellement et, à plus long terme, pour prévenir l'émergence de nouvelles souches recombinantes ou d'origine animale. Les stratégies de vaccination étudiées seront comparées au vaccin commercial actuellement utilisé contre la grippe saisonnière (Vaxigrip®) chez l'Homme. Ce dernier induit une immunité contre seulement 3 sous-types de virus grippaux (les plus représentés dans les infections saisonnières des années précédentes).

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Le primate non humain a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 122 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux :

1) Les différentes interventions (prélèvements de sang, de fluide nasal, trachéal et bronchoaléolaire, immunisations, infection expérimentale) seront faites sous anesthésie générale,

2) Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection). Cet hébergement individuel est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

1951- La grippe est une maladie virale fréquente et contagieuse causée par plusieurs virus à ARN de la famille des Orthomyxoviridae. Elle est responsable d'épidémies saisonnières (propagation rapide d'une maladie infectieuse) et, plus rarement, de pandémies plus meurtrières (épidémie qui s'étend sur une large zone : parfois la planète).

Les objectifs de cette étude sont, dans un premier temps, de développer un modèle d'infection par le virus de la grippe mimant le syndrome grippal humain et, dans un second temps, d'évaluer l'efficacité de nouveaux « candidats vaccins ». Le but est d'identifier des vaccins plus efficaces contre un grand nombre de souches virales différentes, incluant notamment le virus H1N1 responsable de la pandémie grippale de 2009. Les retombées de cette étude auront des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme pour combattre les souches virales circulant actuellement et, à plus long terme, pour prévenir l'émergence de nouvelles souches recombinantes ou d'origine animale. Les stratégies de vaccination étudiées seront comparées au vaccin commercial actuellement utilisé contre la grippe saisonnière (Vaxigrip®) chez l'Homme. Ce dernier induit une immunité contre seulement 3 sous-types de virus grippaux (les plus représentés dans les infections saisonnières des années précédentes).

L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme. Le primate non humain a été choisi afin d'avoir, d'une part, un modèle d'infection par le virus de la Grippe comparable à la maladie humaine et, d'autre part, une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 122 animaux nés et élevés en captivité dans un établissement reconnu. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques adaptés aux petits effectifs. Les méthodes expérimentales ont été conçues pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux :

1) Les différentes interventions (prélèvements de sang, de fluide nasal, trachéal et bronchoaléolaire, immunisations, infection expérimentale) seront faites sous anesthésie générale,

2) Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la

phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection). Cet hébergement individuel est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus.

Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

1952- La transplantation d'organe est la seule issue thérapeutique pour la plupart des pathologies conduisant à une perte irréversible de la fonction des organes vitaux. Le greffon (l'organe transplanté) est étranger à l'organisme du receveur et engendre une réaction immunitaire dite de « rejet », aigu ou chronique qui reste la première cause de perte de fonction du greffon à long terme. L'incidence de rejet aigu à un an après transplantation varie entre 10% (rein) et 50% (poumon) (source : inserm).

Afin d'assurer la réussite d'une transplantation (à savoir prévenir et minimiser les rejets afin de garantir une survie à long terme des greffons), le patient est soumis à un traitement immunosuppresseur visant à déprimer son immunité. Ces traitements diffèrent en fonction de la période après la greffe. Parmi les traitements dit "d'induction" administrés immédiatement après la greffe, le plus largement utilisé demeure le Sérum Anti-Lymphocytaire (SAL) ou globulines (IgG) anti-lymphocytaires.

Ces anticorps sont produits par l'immunisation d'animaux (IgGs de lapin actuellement commercialisés) contre des antigènes lymphocytaires humains. Cependant, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires en relation avec l'immunisation des receveurs contre les antigènes « animaux », parmi lesquels la maladie sérique qui associe fièvre, arthralgies, et lésions au niveau de la greffe.

Des travaux récents ont montré une relation entre la maladie sérique (MS) est une survie écourtée du greffon et caractérisent plusieurs antigènes impliqués dans la survenue de cette MS. Ces travaux ouvrent la possibilité de produire un « SAL innovant » capable de limiter la survenue de cet effet indésirable. Un nouveau procédé de production a fait l'objet d'une demande de brevet et ce projet a trait à apporter une première étape de validation de cette invention.

L'objectif principal de ce projet est de valider i) l'efficacité immunosuppressive de ce nouveau SAL (LIALS) sur le système immunitaire d'un animal immunocompétent dont le système immunitaire est proche de celui de l'homme: le babouin; et ii) l'innocuité in-vivo de cette nouvelle stratégie thérapeutique.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 4. Dans un souci de respect de la règle des 3R, le groupe contrôle négatif ne sera composé que d'un seul animal, et le 3ème animal du groupe d'étude ne recevra le réactif que si les résultats des deux 1er animaux sont discordants. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, tous les protocoles de ce projet seront réalisés chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

1953- Le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique majeur avec plus de 300 millions de porteurs chroniques dans le monde. Les traitements actuels ciblent efficacement l'enzyme polymérase du virus, permettant de contrôler sa réplication tant que le traitement est présent. Cependant ils ne permettent pas à ce jour d'inhiber la production des protéines virales qui exercent toujours leurs effets délétères, ni d'éradiquer le virus chez les patients infectés. Il y a donc nécessité de tester de nouveaux traitements ciblant une autre étape de l'infection. Les études dans les modèles in vitro d'infection par le VHB sont limitées: en effet les modèles cellulaires in vitro/ex vivo tels que les hépatocytes primaires ne se maintiennent pas en culture sans perte de leur statut de cellules différenciées. Les modèles in vitro ne reflètent pas la complexité des hépatocytes primaires différenciés tel qu'ils sont in vivo dans l'environnement mimant l'architecture hépatique. De plus, ces lignées cellulaires ne permettent pas de valider les molécules du point de vue du métabolisme et de la pharmacologie. Les résultats obtenus in vitro doivent donc être impérativement confirmés dans un modèle in vivo intégrant la complexité du cycle viral, de la régulation du métabolisme énergétique et des voies métaboliques. Dans ce contexte, le modèle de souris immunodéficientes (sans système immunitaire) humanisées après une greffe d'hépatocytes humains et infectées par le VHB est à ce jour, en dehors des primates, le modèle animal le plus pertinent pour cette étude.

Les objectifs de cette étude sont multiples :1) Caractériser de manière exhaustive les infections par le VHB par les différents génotypes et 2) Evaluer l'activité antivirale d'agents thérapeutiques.

En terme de retombées scientifiques, ce projet intégrée à une plateforme de souris humanisées pour le foie permettra de répondre à un besoin urgent de la recherche fondamentale et translationnelle sur les maladies infectieuses hépatotropes, permettant aux équipes impliquées dans ce domaine de bénéficier du savoir faire expérimental de la plateforme.

Ce projet est donc déposé au titre d'une plateforme de souris humanisées, qui permettra à différentes équipes collaborateurs / partenaires de bénéficier de ce modèle d'étude in vivo.

Le nombre de souris ainsi que les schémas expérimentaux ont été réfléchis et adaptés afin de respecter la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner). Pour chacune de ses procédures, le nombre d'animaux a été réduit au nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris.

Le nombre maximal de souris est estimé à 5690 sur 5 ans (plateforme pour supporter au moins 5 projets sur les infections HBV)

1954- Le sepsis correspond à une réponse inflammatoire généralisée de l'organisme en réaction à une infection. On définit le sepsis sévère s'il est associé à une ou plusieurs défaillances d'organes, et le choc septique s'il induit une hypotension. Dans ces deux cas cette réponse complexe de l'organisme est excessive ou inadaptée, nécessitant la mise en œuvre de suppléances des grandes fonctions en réanimation pour éviter le décès. Malgré ces suppléances coûteuses, les taux de mortalité de ces patients, 1 et 2 mois après le début de l'épisode, sont respectivement de 30 et 42%. De plus, le nombre de lits de réanimation disponibles pour les traiter efficacement est limité. Le sepsis entraîne ainsi un nombre de décès très important légèrement supérieur à ceux causés par l'infarctus du myocarde et sont la première cause de décès à l'hôpital. Actuellement, le traitement de cette urgence médicale consiste en l'administration dans l'heure d'antibiotiques, associée à un remplissage, à une oxygénation, à l'introduction de catécholamines et à la prise en charge en réanimation en l'absence de traitement spécifique en dehors de l'administration controversée de corticoïdes à faible dose.

Au niveau de la microcirculation, l'interaction des cellules phagocytaires et de l'endothélium est considérée comme un élément majeur dans la survenue des défaillances viscérales secondaires au sepsis sévère et au choc septique. Ces défaillances viscérales peuvent conduire au décès. Les dérivés réactifs de l'oxygène (respiratory burst) générés par la lutte contre les agents infectieux ont un rôle majeur dans la dysfonction endothéliale première étape vers les défaillances multi-viscérales et le décès. Le sélénium est un atome bivalent en physiopathologie. Sur le plan biochimique, les petits composés sélénés sont souvent des molécules oxydantes toxiques. Par contre incorporé dans les enzymes sélénés, le sélénium permet à celles-ci d'être un élément clef de la défense anti-oxydante chez les mammifères. Les protéines sélénées, comme la sélénoprotéine-P, participent à la protection anti-oxydante de l'endothélium. Par ailleurs, les petits composés sélénés non-organiques oxydants de type sélénite de sodium pourraient -par une hyper-oxydation paradoxale- réduire l'hyper-activation des cellules phagocytaires et contrôler l'hyper-inflammation. Le lipopolysaccharide (LPS) issu de la paroi des bacilles gram négatif est un modèle classique d'induction de choc septique chez l'animal et en particulier le rat. La toxicité du sélénite a été étudiée dans ce modèle.

Le présent projet vise à comparer le taux de lactates d'animaux ayant reçu plusieurs types de traitement (perfusion avec soluté isotonique, protéines sélénées, sélénite de sodium en perfusion ou en injections répétées, combinaison de protéines sélénées et de sélénite) avec ces valeurs mesurées chez des animaux ne recevant aucun traitement. Pour cette raison 6 groupes expérimentaux de 6 rats sont constitués, soit 36 animaux au total.

Le recours à l'animal est indispensable car l'objectif est d'évaluer à la fois l'efficacité des produits sur les aspects circulatoires et tissulaires du choc septique et d'évaluer la toxicité des deux préparations, ces deux objectifs ne pouvant être réalisés sur des modèles cellulaires. La taille des groupes expérimentaux est aussi réduite que possible et l'évaluation, dans la même étude, des modes d'administration et des deux composés permet de réduire le nombre d'animaux des groupes contrôle. Pour cette étude, les animaux seront maintenus sous anesthésie générale de l'établissement du choc septique jusqu'à leur euthanasie

1955- Ce projet s'inscrit dans la formation réglementaire à l'expérimentation animale (niveau praticien), que nous proposerons à des étudiants de Licence professionnelle. Cette formation sera intégrée dans les enseignements de ce diplôme professionnalisant, puisque de nombreux points du programme de la formation à l'expérimentation animale sont déjà abordés dans les enseignements théoriques et pratiques. Elle sera non obligatoire et suivie par 20 personnes maximum par an.

Ce projet consiste à former des étudiants d'un point de vue pratique sur les procédures faiblement invasives chez le rat (procédures régulièrement utilisées en expérimentation animale), puis de contrôler leurs connaissances pratiques afin de valider la formation réglementaire.

En complément des enseignements théoriques (cours, vidéos, photos) et après démonstration par un enseignant, différents points techniques seront abordés sur des rats mâles ou femelles WISTAR : manipulation du rat vigile (préhension, contention), administration de sérum physiologique par voie intra-péritonéale (IP) et par voie intra-musculaire (IM), prélèvement de sang par voie intra-veineuse (IV), administration d'eau distillée par voie orale. Une attention particulière sera portée sur les volumes maximum à injecter et sur les tailles des aiguilles ou des canules adaptées à chacune des voies d'administration.

Enfin, le contrôle pratique sera réalisé individuellement par les étudiants sur les rats déjà utilisés lors du TP précédent. Les étudiants devront réaliser uniquement les pratiques suivantes: manipulation du rat vigile (préhension, contention), administration de sérum physiologique par voie IP, administration de sérum physiologique par voie IM.

* Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été calculé de manière à prendre en compte le degré de stress et/ou de douleur potentiellement occasionné chez l'animal, tout en permettant une bonne formation pratique des étudiants. L'administration par voie orale sera réalisée une fois par rat et par un étudiant, l'injection par voie IP et le prélèvement de sang par voie IV seront réalisés une seule fois par rat et par un étudiant et enfin l'injection IM sera réalisée par 2 étudiants alternativement sur le même rat (une IM par cuisse). Un enseignant réalisera une démonstration de chaque procédure en utilisant 3 rats. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'ensemble des rats sera réutilisé pour le contrôle pratique, mais au minimum 4 jours après la formation pratique pour un meilleur confort de l'animal. Au total, 68 rats maximum seront utilisés par an pour 20 étudiants, soit un total de 340 rats pour 5 ans. Ce chiffre sera bien entendu revu à la baisse si le nombre d'inscrits à la formation est inférieur à 20.

* Raffinement : Les animaux utilisés dans ce projet seront hébergés dans une cage adaptée de 1050 cm² (3 ou 4 rats selon leur poids), par groupe socialement harmonieux, avec un enrichissement (tunnel plastique...) et dans un environnement sonore et lumineux adapté à l'espèce. Les animaux auront été habitués à la préhension / contention avec le personnel de l'animalerie, afin qu'ils soient moins stressés lors des procédures réalisées par les étudiants. Avant toute intervention sur l'animal, les étudiants auront visionné les différentes procédures à exécuter sur des vidéos et/ou images et également en démonstration par les enseignants. La pratique des étudiants sur l'animal ne sera réalisée que sous contrôle rigoureux des enseignants. Une attention particulière sera portée sur la nécessité de travailler dans le calme afin d'éviter tout stress inutile chez l'animal. Enfin une même procédure ne sera pas réalisée deux fois sur un même animal. Ainsi lors du contrôle, la procédure effectuée sur chaque rat sera différente de celle réalisée pendant la formation pratique.

* Remplacement : Afin de valider la formation réglementaire à l'expérimentation animale (niveau praticien), il est nécessaire que les étudiants pratiquent les techniques les plus usuelles et les moins invasives (IM, IP, IV et par voie orale) sur animal vigile pour les maîtriser et ceci en complément des autres supports utilisés (vidéos, démonstrations...).

1956- Les cytokines sont des protéines naturelles qui assurent la communication intercellulaire et orchestrent les réponses immunitaires et inflammatoires. La surexpression des cytokines a été identifiée comme l'une des causes de l'apparition ou du développement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses.

Les médicaments, et en particulier les immunothérapies passives telles que les anticorps monoclonaux, qui bloquent l'activité d'une cytokine cible, ont récemment fait leurs preuves dans le traitement de ces pathologies. Par exemple, les produits bloquant le TNF α (Tumor-necrosis factor) ont un impact majeur sur le traitement de maladies auto-immunes inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), la maladie de Crohn (CD) ou encore le psoriasis.

Cependant, les approches actuelles souffrent de certaines limites : les anticorps monoclonaux ne ciblent qu'un seul épitope et ne sont pas toujours efficaces pour des cibles variables ou existantes naturellement sous forme de multiples sous-types. L'administration de protéines 'étrangères' peut générer une résistance amenant une perte d'efficacité et d'éventuels effets secondaires. Ces médicaments sont onéreux, ce qui pose des problèmes d'accessibilité, tant pour les organismes de santé que pour les patients ; ils requièrent des injections fréquentes donc contraignantes, et enfin sont susceptibles de supprimer l'activité bénéfique de la cytokine-cible sur les tissus sains.

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie active reposant sur la production, par le système immunitaire du patient, d'anticorps anti-cytokine après administration d'un candidat vaccin (cytokine cible couplée à une protéine porteuse) a été développée : Le Kinoïde.

Cette administration est réalisée sous forme d'émulsion avec un adjuvant de type huileux qui induit une réponse naturelle d'anticorps polyclonaux spécifiques de la cytokine-cible, capable de neutraliser son activité pathologique.

Expérimentation animale

L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire (réponse humorale) ne pouvant s'effectuer que sur animaux vivants, les candidats Kinoïdes seront testés sur des souris consanguines (*Mus musculus* de l'espèce BALB/cBy), orientées réponse humorale et la production d'anticorps) afin de valider l'apparition des anticorps anti-cytokine générés au cours du protocole d'immunisation. Le nombre d'animaux par groupe sera limité à 10, conférant une puissance statistique satisfaisante pour ce protocole expérimental. Au maximum 250 animaux par an seront utilisés.

Les souris seront injectées 5 fois au maximum et 5 prélèvements de sang seront effectués sur une période de 6 mois environ. Pour évaluer la réponse immunologique des ELISA et des tests de capacité neutralisante des anticorps induits seront réalisés. Ce protocole permettra de valider la dose à injecter lors des rappels.

Les animaux disposent d'une période d'acclimatation conséquente (minimum 7 jours) avant l'initiation de tout protocole, afin de limiter l'angoisse subie. Les contraintes imposées à l'animal sont ensuite très modérées. Les injections intramusculaires et les prélèvements au sinus retro-orbital ont lieu de façon ponctuelle et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Seul le stress de la contention impacte brièvement leur comportement. De plus, une période de repos suffisamment longue entre chaque traitement (minimum 7 jours) est appliquée, pour ne pas imposer une fréquence de traitements trop soutenue qui perturberait le bien-être des animaux. Enfin, les animaux sont examinés de façon quotidienne afin d'évaluer les points limites de l'espèce : si un animal présente l'un des points limite à un seuil critique, il est mis à mort afin d'abrégier sa souffrance.

1957- La leucémie myéloïde chronique est une affection maligne hématologique due à l'apparition de l'oncogène BCR-ABL dans une cellule souche primitive du sang. La maladie humaine évolue en 3 phases, allant d'une phase chronique vers une phase accélérée puis de transformation tumorales proprement dite, l'ensemble évoluant sur une période de 3-4 ans. Cette hémopathie est un modèle de thérapies ciblées car l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'oncogène BCR-ABL a permis de transformer l'histoire naturelle de cette maladie mortelle en prolongeant la survie des malades. Bien que l'on puisse obtenir des rémissions très prolongées, les cellules souches leucémiques les plus primitives ne peuvent être totalement éliminées. L'arrêt du traitement entraîne donc une rechute nécessitant la reprise du traitement. Il n'existe à ce jour aucun modèle en particulier murin pour modéliser la maladie, notamment son évolution chronique. Le transfert du gène BCR-ABL dans les cellules souches de souris entraîne une maladie mortelle en 2-3 semaines qui ne permet pas d'étudier les phases précoces et surtout de déterminer les caractéristiques des cellules qui persistent pendant le traitement. Dans ce projet nous proposons de modéliser la maladie chez le singe macaque. Pour ce faire, nous prélèverons des cellules souches dans la moelle osseuse, nous introduirons l'oncogène BCR-ABL dans ces cellules in vitro, puis nous les grefferons par voie intraveineuse chez les singes macaques dont elles sont issues. Les animaux seront ensuite suivis par des prises de sang tous les mois qui permettent de réaliser des analyses pour détecter l'apparition d'une leucémie. Les animaux seront ensuite traités par le médicament utilisé

chez l'Homme afin de tuer les cellules cancéreuses. Les effets de ce traitement seront suivis par des prélèvements de sang mensuels. Après arrêt du traitement, l'effet de rechute qu'on observe chez les patients sera suivi et les cellules souches résistant au traitement seront récupérées par ponction de la moelle osseuse, et caractérisées. Les animaux utilisés pour l'expérimentation sont des animaux adultes (entre 6 et 10 ans). Les procédures expérimentales envisagées sont classées « légères » à « modérées ». Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'expérience afin, d'une part de réaliser une analyse plus complète de la moelle osseuse, et d'autre part de ne pas conserver des animaux sous traitements inutilement.

Le projet sera mise en œuvre sur 4 singes cynomolgus, ce qui représente le nombre minimal pour une étude dans ce domaine. Chez l'Homme, les réponses hématologiques (disparition des anomalies dans le sang) sont quasi identiques d'un patient à l'autre, mais l'éradication des cellules souches médullaires est très variable. Certains patients rechutent après une réponse et surtout tous ont des cellules souches qui persistent sous traitement, à l'origine des rechutes quand on l'arrête. L'utilisation de 4 singes nous permettra donc d'étudier la variabilité interindividuelle dans la réponse au traitement. Le coût élevé des expérimentations constitue également une incitation forte pour réduire le nombre d'animaux et d'expériences.

Tous les animaux entrant dans le laboratoire ont accès à un logement dans de grandes volières, et sont inclus dans des groupes sociaux, avec du matériel de fourrage et de multiples formes d'enrichissement (perchoirs, tunnels, cachettes).

1958- Chez les mammifères, les femelles sont porteuses de deux chromosomes X alors que les mâles n'en ont qu'un. Les mammifères ont développé des mécanismes pour "éteindre" un des deux chromosomes X chez les femelles. Cette extinction évite que les produits des gènes situés sur le chromosome X soient deux fois plus abondants chez les femelles que chez les mâles et donc que des anomalies se produisent au cours du développement et chez l'adulte. Les mécanismes de cette extinction d'un chromosome X dans les embryons femelles ont été analysés dans trois espèces de mammifères : la souris, considéré comme modèle général, le lapin et l'homme. Il a été mis en évidence que chacune de ces trois espèces procède de façon différente. Comprendre quel chromosome X est éteint (celui apporté par le père ou celui apporté par la mère) et comment il est éteint (à quel stade du développement et par quels mécanismes moléculaires), permettra de mieux prévoir les caractères des animaux en fonction de la génétique de leurs parents. Cette prévision est souhaitée en élevage bovin mais les connaissances sur la mise en place de ce mécanisme d'extinction d'un chromosome X sont encore très incomplètes dans cette espèce. Ce projet vise donc à comprendre comment au sein de chaque cellule, les gènes du chromosome éteint sont inactivés. A cette fin, nous souhaitons pratiquer un séquençage du transcriptome d'une vingtaine de cellules uniques sur un minimum de cinq embryons femelles de bonne qualité. Cet objectif implique la collecte d'une vingtaine d'embryons parmi lesquels les embryons femelles seront sélectionnés après extraction des ARN et ADN de chaque embryon et utilisation de l'ADN pour sexage. Le matériel extrait des embryons mâles sera utilisé ultérieurement dans d'autres projets de recherche. En choisissant le taureau et les femelles impliqués dans ce protocole de telle sorte qu'ils soient porteurs d'allèles différents pour un certain nombre de gènes du chromosome X, nous aurons accès à la connaissance du chromosome actif et du chromosome éteint pour chacune des cellules de l'embryon. La partie principale du projet envisage de collecter plusieurs séries d'échantillons biologiques chez l'animal vigile de l'espèce bovine. Des ovocytes sont prélevés en début de cycle reproducteur par la méthode de ponction des ovocytes dans l'ovaire pratiquée dans les élevages bovins dédiés à la production d'embryons, afin de caractériser les produits issus de l'expression du génome (transcriptome) de l'ovocyte qui nous renseignent sur les allèles maternels. Des embryons âgés de 10 jours environ sont collectés par lavage des cornes utérines en vue de pratiquer les analyses de transcriptome préalablement décrites. Le projet portant sur l'obtention d'ovocytes et d'embryons de 10 jours environ, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Le projet inclura donc dix génisses donneuses d'abord d'ovocytes puis d'embryons. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons réduit au maximum les répétitions inutiles. En particulier l'application de traitements de superovulation permet de réduire le nombre d'animaux impliqués et le nombre des interventions sur chaque animal à un minimum. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie, maîtrisés et pratiqués par des personnels expérimentés dans l'unité, ont été définis et validés par une équipe vétérinaire.

1959- L'épilepsie du lobe temporal (MTLE) est la forme d'épilepsies la plus réfractaire aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle-seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique. De nouvelles stratégies thérapeutiques visent non plus à traiter l'épilepsie lorsqu'elle est diagnostiquée, mais à bloquer son hypothétique installation suite à un événement à risque tel un traumatisme lésionnel.

L'objectif de cette étude vise à évaluer sur le modèle MTLE chez la souris, si le Fycompa® (pérampanel), nouvel anti-épileptique ayant un mode d'action innovant (AMM en 2012 - mise sur le marché français en 2013), peut bloquer l'installation d'une épilepsie s'il est délivré dans des délais très courts suite à un traumatisme lésionnel, tel un accident de voiture par exemple. Effectivement les traumatismes lésionnels sont souvent la cause de l'installation d'une épilepsie, qui peut prendre plusieurs années avant d'être diagnostiquée.

Dans le strict respect de la règle des 3R, l'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites (Raffinement), le nombre d'animaux (n=30) inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses (Réduction), et enfin il faut préciser qu'il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro (Remplacement) en suppléance à l'approche in vivo.

1960- Le microbiote intestinal est considéré aujourd'hui comme un organe du corps humain à part entière. Celui-ci assure différentes fonctions, comme la nutrition, la maturation du système immunitaire ou encore la défense contre des pathogènes. Le microbiote est composé de plusieurs milliards de microorganismes très divers. De nombreux travaux récents montrent des associations entre la modification de la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et certaines maladies humaines (ex : diabète, obésité). Dans le cas de certaines maladies, la tolérance habituelle de l'organisme à ce microbiote est altérée, et il en résulte une inflammation intestinale. C'est le cas dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) comme la maladie de Crohn et la Rectocolite Hémorragique. Bien que non mortelles, ces maladies handicapent lourdement la vie des patients, et ont un fort impact socio-économique. A ce jour, aucun traitement curatif n'a été trouvé.

Plusieurs études montrent que les patients atteints de ces maladies présentent des dysbioses du microbiote intestinal. Celles-ci sont caractérisées par la disparition d'espèces bactériennes clés dans l'équilibre du microbiote intestinal et la régulation de la réponse inflammatoire. Les raisons de ce déséquilibre ne sont pour l'instant pas connues.

Le but de notre projet est de comprendre si les virus de bactéries, appelés Bacteriophages ou Phages, ont un impact sur l'équilibre entre espèces du microbiote intestinal, notamment en réaction à des stress inflammatoires. Nous utiliserons des souris hébergeant un microbiote intestinal constitué d'un ensemble de souches bactériennes commensales connues. Ces souches bactériennes seront implantées par gavage. L'évolution des populations bactériennes en fonction de l'activité de leurs phages et de l'inflammation intestinale sera suivie grâce à un prélèvement régulier des fèces de souris. L'inflammation sera créée soit par traitement chimique en ajoutant du Dextran Sulfate Sodium dans l'eau de boisson, soit par infection bactérienne avec la bactérie pathogène *Citrobacter rodentium*.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons réalisé au préalable des expériences in vitro sur l'activité de chacun des phages utilisés. D'autre part les protocoles ont été mis au point avec des fèces de souris conservées lors d'expériences antérieures. L'étude de l'impact de l'inflammation sur l'activation des phages impose le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro réunissant tous les paramètres du tube digestif (réponse inflammatoire, interaction hôte-bactérie, milieu de propagation des phages). Ce projet de 5 ans utilisera au maximum 330 souris à microbiote contrôlé. Nos groupes de souris seront composés de 20 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous veillerons à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

1961- Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe et des anomalies cérébrales structurelles comprenant, en outre, une agénésie partielle du corps calleux, une dysplasie du cervelet, ou encore une hétérotopie frontale de la substance grise. Le pronostic des perturbations du SNC est encore confus du fait du faible nombre de patients recensés. Le CMCS semble être la conséquence de mutations du gène *GPSM2* (G Protein Signaling Modulator 2), sans que l'on connaisse les bases moléculaires de cette pathologie. Si le CMCS est une maladie très rare, la surdité est, elle, le désordre sensoriel le plus retrouvé à la naissance chez l'homme (1-1.5/1000). De plus, étant donné l'allongement de notre espérance de vie, les problèmes d'audition et d'équilibre sont un problème de santé publique majeur. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable. Nous souhaitons en particulier générer des animaux mutants pour le gène *mPins*, l'homologue murin de *GPSM2*. Des résultats de notre groupe (Ezan et al., 2013) suggèrent aussi que *Gnai3*, un autre gène, est un partenaire crucial de *mPins*, y compris lors du CMCS, nous souhaitons donc aussi générer des animaux mutants pour le gène *Gnai3*, afin de comparer les deux souris mutantes. Notre projet visera à élucider les bases moléculaires du CMCS, à la fois dans l'oreille interne et le système nerveux. Nous évalueront également le rôle de *mPins* et *Gnai3* dans la fonction adulte du cerveau. Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau et de l'oreille dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe et des anomalies cérébrales structurelles comprenant, en outre, une agénésie partielle du corps calleux, une dysplasie du cervelet, ou encore une hétérotopie frontale de la substance grise. Le pronostic des perturbations du SNC est encore confus du fait du faible nombre de patients recensés. Le CMCS semble être la conséquence de mutations du gène *GPSM2* (G Protein Signaling Modulator 2), sans que l'on connaisse les bases moléculaires de cette pathologie. Si le CMCS est une maladie très rare, la surdité est, elle, le désordre sensoriel le plus retrouvé à la naissance chez l'homme (1-1.5/1000). De plus, étant donné l'allongement de notre espérance de vie, les problèmes d'audition et d'équilibre sont un problème de santé publique majeur. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable. Nous souhaitons en particulier générer des animaux mutants pour le gène *mPins*, l'homologue murin de *GPSM2*. Des résultats de notre groupe (Ezan et al., 2013) suggèrent aussi que *Gnai3*, un autre gène, est un partenaire crucial de *mPins*, y compris lors du CMCS, nous souhaitons donc aussi générer des animaux mutants pour le gène *Gnai3*, afin de comparer les deux souris mutantes. Notre projet visera à élucider les bases moléculaires du CMCS, à la fois dans l'oreille interne et le système nerveux. Nous évalueront également le rôle de *mPins* et *Gnai3* dans la fonction adulte du cerveau. Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau et de l'oreille dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser.

Pour créer des souris dont le gène *mPins* ou le gène *Gnai3* est inactivé dans un tissu spécifique nous utilisons le système Cre-loxP. Dans ce système le génome de souris dites « Cre » a été modifié afin d'exprimer la recombinase Cre. Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « loxP ». En croisant les

souris «mPins-loxP» ou «Gnai3-loxP» avec les souris « Cre » on obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme Cre excise le gène de l'ADN mPins ou Gnai3. Afin de contrôler la délétion du gène mPins ou Gnai3 dans l'espace-temps on utilise un promoteur spécifique de la Cre recombinase.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Raffiner : Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès prénataux ou postnataux pouvant être associés aux animaux knock-out. Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 couples de souris sera utilisé pour produire la génération de souris désirée. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 couples (1 males et 2 femelles) seront hébergés en continu. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 153 animaux pour chaque lignée, soit 306 animaux.

1962- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) résultent de perturbations de la circulation sanguine cérébrale, à l'origine de lésions cérébrales plus ou moins sévères.

En France, les AVC représentent la 3e cause de mortalité et la 1ère cause de handicap physique chez l'adulte, et l'incidence risque d'augmenter en raison du vieillissement croissant de la population et de l'absence de traitements efficaces.

Parmi les AVC, 20% est d'origine hémorragique, par rupture soudaine d'une artère cérébrale, et la majorité (80%) est d'origine ischémique, c'est-à-dire due à l'occlusion d'une artère par un caillot.

Après un AVC ischémique, le seul traitement disponible est un fibrinolytique, qui permet de restaurer la circulation cérébrale, en détruisant le caillot. Toutefois, cette stratégie n'est pas pleinement satisfaisante, car elle permet de lutter uniquement contre la cause de l'ischémie. De plus, son utilisation est limitée: elle doit être administrée dans les 4h30 après l'apparition des premiers symptômes et elle peut entraîner des hémorragies cérébrales.

A l'heure actuelle, il n'existe donc toujours aucun traitement pour lutter contre les conséquences des AVC. C'est pourquoi, de nombreux chercheurs travaillent sur des stratégies qui pourraient réduire les hémorragies cérébrales induites par le fibrinolytique, en protégeant la paroi des vaisseaux sanguins.

Nous avons montré, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris, le bénéfice d'une stratégie thérapeutique dans la réduction des hémorragies cérébrales induites par le fibrinolytique et ceci en protégeant la paroi des vaisseaux sanguins.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est de vérifier si la réduction de ces saignements induite par notre thérapie ne pourrait pas être liée, en plus de la protection de la paroi vasculaire, à un effet sur l'hémostase. L'hémostase représente l'ensemble des phénomènes qui permet d'arrêter un saignement et de maintenir la fluidité du sang dans les vaisseaux. Il paraît donc primordial de vérifier que notre stratégie thérapeutique n'entraîne pas une hémostase dans un contexte d'ischémie cérébral.

Pour cela, nous étudierons les effets de notre stratégie thérapeutique dans 3 modèles expérimentaux (un modèle de temps de saignement; un modèle de thrombose artérielle; un modèle de thrombo-embolie pulmonaire), nécessitant ou non de la chirurgie, qui permettent d'explorer différents aspects de l'hémostase chez la souris.

Ces expériences nécessiteront l'utilisation de 330 souris dont l'anesthésie sera monitorée durant la durée de l'expérience. La bonne reproductibilité et le faible taux d'échec (10%) de ces 3 modèles expérimentaux permettent de limiter le nombre de souris par groupe. La mise en place d'un point limite et l'observation des souris permettront d'identifier toute souffrance et douleur.

Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée in vitro. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'hémostase mettant en jeu différentes cellules et molécules, il est indispensable d'associer aux études in vitro des études chez l'animal vivant

1963- Les carcinomes de la cavité buccale et de l'oropharynx nécessitent le plus souvent un traitement chirurgical associé à une radiothérapie complémentaire. Dans certains cas, une ostéoradionécrose de la mandibule peut survenir, le traitement nécessitant une ablation de l'os. La technique de reconstruction classique, le lambeau libre microanastomosé de péroné, est lourde et n'est pas toujours réalisable. Devant cette limite, la place de l'ingénierie tissulaire reste à préciser. Les études menées chez l'animal en territoire irradié ont montré que l'association d'un biomatériau phosphocalcique (de type BCP) à de la Moelle Osseuse Totale (MOT) permettait d'obtenir une néoformation osseuse.

De récentes études ont montré un bénéfice à l'injection d'un lysat de cellules de moelle osseuse, en particulier dans un modèle murin d'infarctus myocardique. Ce bénéfice était comparable à celui obtenu après injection de moelle osseuse totale. Une autre étude utilisant la même préparation retrouvait un bénéfice sur la fonction de glandes salivaires irradiées, que ce soit après injection intra-glandulaire ou intra-veineuse. Ces résultats s'appuient sur l'action paracrine des cellules de moelle osseuse permettant une amélioration de la fonction des organes.

L'intérêt de l'utilisation de ces extraits de cellules de moelle osseuse est de s'affranchir de leur potentiel immunogène. En effet, dans le but d'appliquer cette recherche à l'homme, l'utilisation d'une moelle hétérologue pourrait être envisagée, afin d'augmenter la quantité disponible pour la reconstruction d'os irradié. L'objectif de ce travail est donc de comparer l'efficacité, de la Moelle Osseuse Totale et du lysat de moelle osseuse en injection intra-veineuse, en association ou non avec un biomatériau phosphocalcique, dans l'os irradié. Cette étude serait réalisée sur des rats consanguins de souche Lewis 1A, avec un modèle d'irradiation habituellement utilisé en laboratoire.

Pour cela une étude sur 12 conditions devra être répétée, avec plusieurs animaux donneurs de moelle osseuse, soit un total de 48 animaux prévus. Les animaux étudiés seront divisés en 4 groupes comprenant chacun 8 rats. Chaque groupe sera défini par

l'injection intraveineuse reçue (Moelle Osseuse Totale / Lysat de Moelle / Milieu de culture de cellules de moelles / Serum physiologique). 16 animaux donneurs de moelle seront nécessaires.

Nous avons tenu compte des 3R pour la réflexion dans l'élaboration du projet : Le nombre de condition prend en compte la puissance statistique recherchée en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaires, chaque procédure opératoire est réalisée sous anesthésie générale, précédée d'une analgésie par Buprenorphine et une analgésie post opératoire par Metacam est prévue en cas de souffrance de l'animal constatée. Enfin il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation réalisée par une équivalence in vitro, aucun modèle d'ostéoradionécrose n'étant développé in vitro ce jour. Chaque étape de l'étude est mise en place en tenant compte du bien être de l'animal de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son sacrifice pour analyse à la fin de l'étude.

1964- Même si les 50 dernières années ont vu d'importantes avancées dans la prévention, le diagnostic et la prise en charge des maladies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque (IC) reste une exception. Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité reste extrêmement élevée, avec les morts subites comme une cause majeure de décès, dues à des arythmies ventriculaires (AV) dans lesquelles les altérations de flux calciques sont précurseurs. Des études cliniques et expérimentales montrent une association néfaste entre l'aldostérone et son récepteur (MR) et les AV délétères dans l'IC, mais les voies de signalisation associées et les mécanismes sous-jacents sont encore méconnus prévenant par là-même une prise en charge thérapeutique optimale. Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes de l'activation du MR afin d'améliorer les connaissances des mécanismes moléculaires et physiopathologiques de cette activation et devrait permettre le développement futur de thérapies spécifiques ciblant le MR pour soigner l'un des principaux fléaux de la société moderne : l'AV maligne.

Notre hypothèse de travail est que l'aldostérone et le MR contrôle l'expression et/ou la fonction des canaux calciques conférant une susceptibilité aux arythmies cardiaques létales. Pour valider cette hypothèse, nous avons construit une lignée de souris transgénique non dommageable permettant, par l'utilisation de techniques non invasives, de suivre la régulation des canaux calciques au cours du temps sans avoir à sacrifier des animaux à différents intervalles de temps et donc d'en limiter le nombre dans la limite statistique raisonnable d'une étude scientifique, soit un total de 95 souris transgéniques.

L'utilisation d'animaux se justifie par la nécessité d'étudier la fonction cardiovasculaire dans un contexte physiopathologique, notamment au cours de l'IC, un processus complexe impossible à simuler in vitro.

Notre stratégie conçue pour respecter le principe des 3R, permet de réduire le nombre d'animaux utilisé, chacun étant son propre contrôle avant et après les procédures ainsi qu'en permettant une analyse globale de tous les organes cibles sur chaque animal. De plus, les animaux sont sacrifiés en fin d'expérimentation et les tissus/cellules prélevés sont utilisés par plusieurs expérimentateurs pour différentes études. Les procédures utilisées se font dans le cadre adapté d'un hébergement agréé, respectent au maximum le bien-être des animaux (de l'enrichissement étant ajouté dans les cages), en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour éviter tout stress.

1965- Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes dont l'activité en contexte normal constitue une barrière contre l'apparition de cancers. Leur inactivation ou le contournement des mécanismes qu'ils mettent en place constitue une étape déterminante dans l'acquisition de caractéristiques tumorales. La compréhension de leur mécanisme d'action et la découverte de nouveaux gènes se comportant comme suppresseur de tumeur est donc d'une importance capitale pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses. Notre laboratoire a mis en évidence que le gène Notch3 codait pour une protéine dont l'expression est diminuée dans les tumeurs du sein par rapport aux tissus normaux. Par ailleurs, nous avons montré in vitro que l'expression de Notch3 dans des cellules de cancers du sein triple négative entraînait une diminution de la prolifération cellulaire. Cette observation est d'autant plus intéressante que les cancers du sein triple négatifs, c'est à dire qui n'expriment aucun des récepteurs pour lesquels des thérapies ciblées ont été développées, sont les cancers du sein les moins bien pris en charge d'un point de vue thérapeutique. L'étude de ce sous-type de cancers est donc d'une importance capitale pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques. Nous allons donc vérifier dans des modèles pré-cliniques murins l'effet de l'expression de ce gène sur la croissance tumorale et tester la possibilité de cibler cette voie pour traiter les cancers du sein triple négatifs. Pour cela, nous adopterons trois approches : la première consistera à forcer l'expression de Notch3 dans des modèles de croissance tumorale qui ne l'expriment pas. Dans un second temps, nous ferons l'expérience inverse qui consistera à inhiber l'expression de Notch3 dans des modèles de cancers du sein qui expriment constitutivement ce gène. Enfin, une troisième approche s'intéressera à cibler ce gène par des anticorps spécifique qui empêche son activation.

Ces études permettront de mieux caractériser le rôle de Notch3 dans des modèles pré-cliniques ainsi que d'effectuer la preuve de concept de la possibilité de cibler cette protéine dans le cadre du développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Au cours de cette étude, nous tiendrons compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Les modèles murins utilisés sont bien caractérisés et couramment utilisés dans le cadre d'études pré-cliniques. Les animaux seront régulièrement surveillés (3 fois/semaine: suivi de la croissance tumorale et pesée). Des points limites précoces et prédictifs sont définis pour limiter toute souffrance ou atteinte de l'état général des animaux. L'atteinte d'un point limite conduira à l'arrêt de la procédure expérimentale et à la mise à mort immédiate de l'animal. La croissance tumorale des modèles contrôles utilisés est bien connue et permet de définir les groupes d'étude afin d'obtenir des résultats exploitables d'un point de vue statistique. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Afin de limiter le nombre d'animaux, des groupes de variances homogène seront effectués avant

traitement. Les analyses des courbes de croissances tumorales seront analysées par ANOVA à deux facteurs (temps/génotype). 285 animaux seront utilisés lors de cette étude.

1966- Lors de l'accouplement, chez les mammifères, la semence est déposée par le mâle dans l'appareil génital de la femelle. Chez le mouton, les spermatozoïdes sont déposés dans le vagin et ils traversent ensuite le col de l'utérus, migrent dans l'utérus et rejoignent le site de fécondation, l'oviducte. Chez cette espèce, la traversée du col de l'utérus est un facteur limitant majeur pour la réussite de la reproduction.

La congélation de la semence permet le stockage patrimonial de semences de races ovines à petits effectifs menacées de disparition. Elle permet également de découpler la production de semence et l'insémination, afin par exemple de réaliser si nécessaire des contrôles de qualité sur la semence avant insémination, ou lorsque les centres de production de semence sont très éloignés des élevages de brebis.

Cependant, le dépôt de la semence congelée dans le vagin conduit à des taux de fertilité nuls ou faibles (10 % de réussite). Pour résoudre ce problème, chez les bovins et les équins, la semence congelée est déposée directement dans l'utérus à l'aide d'un cathéter inséré au travers du col de l'utérus. Cela est impossible chez les ovins du fait de l'anatomie du col qui empêche toute insertion de cathéter. Cela impose de déposer la semence par voie chirurgicale dans l'utérus. Même dans ce cas, la fertilité de la semence congelée est très inférieure à celle de la semence fraîche.

L'objectif de cette étude est de comparer le transit et la survie des spermatozoïdes dans l'utérus pour de la semence fraîche et congelée pour mieux comprendre la perte de fertilité de la semence congelée.

Pour cela, les spermatozoïdes seront déposés par voie chirurgicale sous anesthésie générale dans l'utérus de brebis au moment des chaleurs. Puis les spermatozoïdes seront visualisés dans l'utérus 4h après leur dépôt par une méthode d'endoscopie sous anesthésie générale développée par notre équipe. Les caractéristiques des spermatozoïdes frais et congelés (distribution dans les différents compartiments de l'utérus, mobilité) seront comparées.

Cette étude implique 27 animaux (3 béliers et 2 lots de 12 brebis). Les béliers sont des reproducteurs utilisés dans l'élevage pour la reproduction du troupeau et participent ponctuellement à ce protocole. Les brebis seront soumises une seule fois à ce protocole et retournent en élevage à la fin du protocole. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude et les procédures expérimentales ont été choisis afin de respecter au maximum les pratiques des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement).

Réduction: Les effectifs des lots d'animaux ont été calculés afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec un nombre minimum d'animaux.

Remplacement: La complexité du processus de migration des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle ne peut pas être étudiée par des études *in vitro* et nécessite de réaliser des études expérimentales *in vivo*.

Raffinement : Les brebis sont logées en bâtiment conventionnel sur aire paillée, en groupe, en visibilité et contact des congénères.

1967- Les études prospectives montrent que l'augmentation combinée de la population mondiale et du niveau de vie dans les pays émergents va rapidement et largement accroître la demande en protéines, et plus particulièrement en protéines d'origine animale. En raison de leur composition en acides aminés et de leur digestibilité élevée, ces dernières sont considérées comme le «gold standard» de la nutrition protéique. Toutefois, parce que leur production est limitée par les ressources en eau, en terres agricoles, et en énergie, mais aussi parce que l'élevage a des effets potentiellement négatifs sur l'environnement, de plus en plus d'attention est accordée à d'autres sources de protéines, telles que les végétaux, ceux-ci pouvant être produits en grande quantité, dans des conditions de culture variées. Les freins à l'utilisation de ces protéines en nutrition humaine sont souvent une faible qualité technologique, un goût désagréable, et une qualité nutritionnelle limitée en raison de leur déséquilibre en acides aminés indispensables et de leur digestibilité souvent inférieure à celle des protéines animales. L'enjeu est donc d'utiliser les connaissances actuelles en sciences des aliments et en nutrition, pour produire des aliments protéiques attractifs, de bonne qualité nutritionnelle, à base de produits végétaux.

Dans ce contexte, le projet présenté a pour objectif d'optimiser la qualité nutritionnelle d'un nouvel aliment texturé à base de protéines végétales. La technologie mise au point repose sur un procédé de texturation des protéines de blés qui donne au produit fini, une texture très ferme, particulièrement difficile à obtenir avec des protéines végétales. La technologie offre par ailleurs la possibilité d'incorporer d'autres ingrédients (fèves, pois chiches, légumes ou même fruits) jusqu'à 40%, sans compromettre la texture du produit à la cuisson, et tout en permettant d'adapter l'aliment au goût régional et en optimisant sa composition nutritionnelle. Autre atout de la technologie : la nature sèche du produit permet de s'affranchir de la chaîne du froid et constitue un avantage logistique majeur, notamment pour le grand export et les zones géographiques déficitaires en protéines.

L'index de référence pour mesurer la qualité nutritionnelle d'une protéine alimentaire est le DIAAS (pour 'Digestible Indispensable Amino Acid Score') proposé par la FAO (2013). Il repose sur la composition en acides aminés indispensables (AAI) de la protéine, par rapport à celle d'une protéine de référence permettant de couvrir les besoins de l'homme pour chacun des AAI, et la biodisponibilité de chacun des AAI. La biodisponibilité des acides aminés composant les protéines alimentaires est généralement évaluée par une mesure de la quantité d'acides aminés absorbés avant la fin de l'intestin grêle (digestibilité iléale réelle). Au-delà de la composition en AAI, cette mesure de digestibilité est indispensable pour pouvoir classer les protéines alimentaires les unes par rapport aux autres, et ajuster les apports alimentaires aux besoins. Un autre critère qui peut être intéressant à considérer, notamment pour la nutrition de populations spécifiques telles que les personnes

âgées, est la vitesse de digestion des protéines. En effet il a été clairement démontré que la vitesse de digestion d'une protéine peut très significativement affecter l'utilisation métaboliques des acides aminés qui la composent .

L'objectif principal du projet est d'évaluer la digestibilité et la cinétique de digestion de la protéine de blé texturée, et d'optimiser la formulation nutritionnelle d'un "steak " végétal produit à partir de cette protéine, seule ou en mélange avec d'autres sources de protéines végétales.

Le porc est le modèle animal le plus proche de l'homme en ce qui concerne le régime alimentaire et la physiologie digestive. La FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) recommande son utilisation pour les mesures de digestibilité des protéines. Le miniporc permet travailler sur des animaux adultes, pondéralement stables. La mesure de la digestibilité iléale implique de pouvoir prélever des échantillons de contenu digestif à la fin de l'intestin grêle. Ceci peut être réalisé chez le miniporc équipé d'une canule iléale permanente. Le paramètre le plus aisé à obtenir pour évaluer la vitesse de digestion d'une protéine est l'évolution de l'aminoacidémie postprandiale, mesurée sur des échantillons de sang prélevés en cinétique par l'intermédiaire de cathéters vasculaires permanents. L'implantation de ces dispositifs (canules et cathéters) se fait sous anesthésie générale. Après cicatrisation, la présence de ces dispositifs ne provoquent pas de gêne ni de douleur à l'animal. Bien qu'il existe des dispositifs in vitro qui miment de façon dynamique les processus de digestion, ils ne permettent pas à l'heure actuelle une détermination fiable de la digestibilité iléale et de la vitesse de digestion. L'approche in vivo est donc incontournable. Du personnel formé à ces modèles animaux (chirurgien, personnel technique et scientifique dédié) est présent sur site, et bénéficie d'une longue expérience de ce type d'approches et de mesures. Le fait d'utiliser un plan expérimental en carré latin permet de limiter le nombre d'animaux utilisés. Un minimum de 6 animaux est nécessaire pour la détermination d'une mesure fiable de la digestibilité. Le protocole comportera 2 expériences successives. La première permettra de caractériser les différents ingrédients protéiques utilisables pour élaborer le 'steak' végétal. La dernière permettra de caractériser le produit fini, prêt à être consommé. Au total 16 animaux seront inclus dans le protocole.

1968- Le tryptophane (TRP) est un acide aminé essentiel précurseur de la sérotonine. Celle-ci est un neuromédiateur impliqué dans la régulation de nombreux comportements sociaux chez l'oiseau. Certaines études montrent un effet de l'apport nutritionnel du TRP sur le comportement de la poule pondeuse. Par ailleurs, plusieurs travaux scientifiques réalisés en 2011 et 2012 montrent l'influence du microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez les rongeurs. Afin de mieux comprendre les déterminants d'origine digestive de ces comportements, nous souhaitons (1) savoir si l'apport de tryptophane a un effet sur le comportement social de la caille (2) s'il module le taux plasmatique de sérotonine et (3) s'il existe une interaction avec le microbiote intestinal dans cette action puisque la synthèse de la sérotonine au niveau digestif est très importante.

Nous utiliserons des animaux nourris chaque jour pendant 3 semaines avec un aliment standard ou un aliment supplémenté en TRP et recevant ou non une eau de boisson additionnée d'un probiotique destiné à stabiliser la flore intestinale des volailles.

Groupe 1 sans supplémentation en Tryptophane ni probiotique

Groupe 2 avec supplémentation en Tryptophane sans probiotique

Groupe 3 sans supplémentation en Tryptophane avec probiotique

Groupe 4 avec supplémentation en Tryptophane et probiotique

Les animaux reçoivent l'aliment témoin ou supplémenté pendant 3 semaines, de même pour l'eau. Leur croissance est mesurée. Nous mesurerons également les distances interindividuelles lors d'activités spontanées et leurs réponses lors de tests estimant la motivation sociale et la réactivité émotionnelle.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

REPLACEMENT : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Pour l'analyse des comportements de peur et du comportement social, nous utilisons le minimum d'individus imposé par la variabilité que nous connaissons sur ces comportements, à savoir 30 animaux. Avec cet effectif, nous pouvons espérer détecter un écart de 13% à 25 % entre les groupes selon le critère comportemental considéré. Une telle différence est en accord avec les quelques données que nous avons recueillies dans la littérature.

RAFFINEMENT : Les cailleteaux seront hébergés sur des cages offrant un gradient de température et de luminosité, ce qui leur permet un certain choix pour ces conditions d'ambiance. Les animaux resteront en groupe et auront la possibilité d'explorer des bacs contenant des copeaux. Deux fois par semaine, des objets nouveaux (billes de verre, balles en plastique, morceaux de carton, etc) seront placés dans la cage en remplacement des précédents. Les cailleteaux seront visités deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

1969- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que les colites ulcéraives et la maladie de Crohn, sont des pathologies inflammatoires chroniques complexes chez des individus prédisposés génétiquement mais dont la cause est aujourd'hui inconnue. Les patients souffrent de diarrhées sanglantes, douleurs abdominales, fièvre et de pertes de poids. Tous ces symptômes ont des répercussions importantes sur leur qualité de vie (retentissement psychologique, social...). La prévalence de ces pathologies a nettement augmenté au cours de ces dernières décennies et représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique. A ce jour, des traitements lourds (anticorps monoclonaux) et coûteux sont évalués dans le traitement des MICI mais la rémission des symptômes n'est pas optimale.

Nous avons développé un traitement des allergies alimentaires par voie épicutanée qui s'est montré efficace dans les modèles animaux et lors des premières études cliniques. Ce traitement permet de moduler les réponses immunitaires au sein de l'organisme via l'induction de cellules T régulatrices (Tregs). Les patients atteints de MICI présentent une inflammation du tube digestif, liée à une forte infiltration de lymphocytes T CD4 et un déficit en Tregs. Nous envisageons donc d'utiliser notre méthode épicutanée afin d'induire des cellules Tregs au niveau du tube digestif et donc de traiter la pathologie les MICI. Dans le cadre de projet, un modèle murin de maladie inflammatoire de l'intestin sera mis en place selon les données disponibles dans la littérature scientifique afin d'évaluer le traitement de cette pathologie par voie épicutanée. Nous établirons également la fonctionnalité des Tregs induits par le dispositif cutané, optimiserons notre produit épicutané ainsi que le schéma thérapeutique.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). Il n'existe pas aujourd'hui de méthodes alternatives validées qui permettent de remplacer ce modèle animal dans le cadre de l'étude des MICI et du développement d'un médicament. En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisées tout en préservant la robustesse des analyses statistiques.

Nous envisageons donc d'utiliser 163 souris femelles, âgées de 5 semaines. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal (i.e. analyses de la réponse immunitaire et cellulaire et des symptômes cliniques). Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi l'absence de signes de stress. Des points limites ont été définis précisément dans le cadre des différents protocoles.

1970- Les cancers du sein triple négatifs pour les récepteurs aux estrogènes (ER), à la progesterone (PR) et au récepteur EGFR (Her2) représentent les cas les plus agressifs et présentent des niveaux élevés de marqueurs génétiques associés aux cellules souches mammaires ou liés aux cellules mésenchymateuses. Au sein de ces tumeurs, une réponse liée aux glucocorticoïdes existe. Celle-ci est même retrouvée dans des lésions très précoces telles que les hyperplasies ou les carcinomes in situ suggérant un lien causal de cette réponse dans l'initiation de ces pathologies. Ceci a pu être confirmé dans des modèles in vitro et in vivo montrant la capacité de cette réponse aux glucocorticoïdes à favoriser la transformation néoplasique et le développement de tumeurs mammaires chez la souris. Cette action des glucocorticoïdes repose sur des mécanismes complexes favorisant à la fois l'acquisition de propriétés souches et l'auto-renouvellement cellulaire et une régulation particulière du métabolisme cellulaires plus permissifs aux effets perturbateurs des oncogènes. Ces résultats constituent une base intéressante pour l'analyse de la réponse glucocorticoïde comme nouvelle cible de traitement dans les tumeurs triples- négatives. Afin de valider cette cible, le traitement de souris immunodéficientes greffées par des tumeurs humaines pourraient constituer une première approche préclinique pertinente. Deux principales méthodes seront testées se basant sur le lien entre propriété souche et réponse glucocorticoïde. La première consistera à prétraiter les souris par un inhibiteur de la réponse aux glucocorticoïdes, ceci dans le but de différencier les potentielles cellules souches au sein de la tumeur, afin de les sortir d'un phénotype plus ou moins quiescent et donc peu sensible aux traitements de chimiothérapie conventionnels. Le second protocole à l'inverse consistera à utiliser ces thérapies anti- glucocorticoïdes après un traitement conventionnel de chimiothérapie afin là encore de forcer des phénomènes de différenciation des cellules souches cancéreuses incapable alors de survivre aux stress oncogénique au sein d'un microenvironnement altéré par la chimiothérapie.

Ces interactions métaboliques complexes dans l'environnement tumoral et leurs effets sur la progression tumorale ne peuvent être étudiés qu'in vivo dans des modèles précliniques pertinents. Le nombre des souris utilisées a été réduit au maximum sans toutefois compromettre l'interprétation des résultats. Les animaux seront régulièrement surveillés (3 fois/semaine: mesure de la taille des tumeurs et pesée). Les points limites précoces sont définis pour limiter toute apparition de signe général de souffrance. Tout point limite atteint amènera à une mise à mort immédiate des animaux et à l'arrêt de la procédure expérimentale.

Le nombre d'animaux est de 420 souris

1971- Si l'incidence des fractures du col fémoral tend à diminuer, l'augmentation et le vieillissement de la population prévoit un doublement du nombre de cas en France d'ici à 2050 (150 000 prévisibles contre 65 000 en 2008) ; de même, les prévisions du nombre de prothèses de hanche et genou entre 2005 et 2020 envisagent une explosion du nombre d'interventions.

Grâce à l'utilisation d'une antibiothérapie prophylactique péri-opératoire, à l'amélioration du design des implants, de la technique chirurgicale et des salles d'opération équipées d'un flux laminaire, le taux d'infections d'implants orthopédiques a pu être diminué de façon substantielle. Malgré cela et en raison du nombre toujours plus élevé d'implants utilisés, le nombre d'infections sur matériel orthopédique augmente régulièrement, avec un coût sociétal de prise en charge 6 fois élevé.

L'infection ostéo-articulaire est une complication majeure lors d'arthroplastie de la hanche ou du genou : elle peut conduire au retrait de la prothèse ou à des séquelles fonctionnelles importantes. La bactérie responsable isolée en culture est dans 60% des cas un staphylocoque doré résistant aux traitements habituels, aggravé par la faible diffusion des antibiotiques dans l'os. La plupart des molécules utilisées par voie orale ou sanguine pour le traitement de ce type d'infection possèdent des effets secondaires ou indésirables allant de légers (nausées, vomissements...) à graves (chocs allergiques, toxicité au niveau des reins, des oreilles...).

Parmi les antibiotiques les plus utilisés en cas d'infections sur matériel orthopédique, la vancomycine et la gentamicine sont les plus prescrits en cas notamment d'infection à *Staphylococcus aureus*.

Des implants en titane innovants pourraient prévenir ou soigner ces infections en libérant, de manière contrôlée et au niveau du site d'implantation, un antibiotique, en limitant la résistance bactérienne. Ces implants seront évalués dans un modèle expérimental d'ostéomyélite chez le lapin.

Une infection bactérienne à un *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline (SARM) sera induite par voie intra-articulaire reproduisant ainsi la maladie. Les animaux seront répartis dans 2 groupes : animaux contrôles et animaux traités (mise à mort après traitement de 96 heures). Après numération des bactéries survivantes dans la moelle osseuse et l'os, les résultats obtenus pour les deux groupes seront comparés par un test statistique approprié.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Le nombre de lapins a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et reproductible. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude et des points limites seront mis en place. Afin de mener à bien le projet, le nombre total d'animaux a été estimé à 80 lapins néo-zélandais.

1972- *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la flore commensale pouvant être aussi bien responsable d'infections nosocomiales que d'infections communautaires. Ces infections sont en constante augmentation. Un patient atteint d'une septicémie (infection du sang) peut développer divers complications (endocardite infectieuse ou ostéomyélite) pouvant entraîner une invalidité ou un décès.

Au début des années 60 apparaissent les premières souches résistantes à la méricilline (SARM) et donc à l'ensemble des β -lactamines. Ces souches de *S. aureus* résistantes à la méricilline possèdent le gène *mecA*, support génétique de la résistance à cet antibiotique. Le gène *mecA* est inclus dans une structure plus importante variant de 62 à 221kb appelée, Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*Scmec*).

La vancomycine est l'un des principaux antibiotiques utilisé lors d'infection à SARM. Des difficultés ont été mises en évidence dans son utilisation clinique (toxicité rénale, nécessité d'un cathéter central, monitoring des concentrations sériques). Son efficacité semble diminuée dans les infections à *S. aureus* sensibles à la méricilline (SASM).

Les souches bactériennes qui vont servir durant cette étude sont des souches isogéniques. Cela signifie qu'elles possèdent exactement les mêmes gènes à l'exception du gène *mecA*.

Le 1er objectif de notre étude est de déterminer si l'absence du gène *mecA* est responsable de la différence d'activité de la vancomycine. Le 2nd est de savoir si la présence ou l'absence du gène *mecA* induit une différence de la réponse inflammatoire de l'hôte.

Pour cela 836 souris vont être utilisées. Ce sont des Swiss femelles de 4 semaines de vie (17-20 g). Ce projet est divisé en 3 parties. La première consiste à la détermination de la dose létale d'inoculum (n=48). La partie 2 est une détermination de la dose efficace 50 de la vancomycine (n=96 souris). La partie 3 intègre une comparaison de la réponse inflammatoire entre les 2 souches ainsi que l'impact d'un traitement à la vancomycine sur ces souches isogéniques (n=692). Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R : Réduire au mieux le nombre de souris, Raffiner en mettant en place des points limites et Remplacer au maximum l'utilisation des animaux.

1973- L'obésité est un facteur de risque majeur pour les maladies telles que le diabète de type 2, la stéatose hépatique, les maladies cardiovasculaires et le cancer. L'origine de l'obésité est multifactorielle, le déséquilibre nutritionnel étant le principal contributeur.

Cependant les mécanismes centraux du système nerveux central qui régissent les processus de conversion, le stockage et l'utilisation des nutriments (sucre ou graisse) demeurent encore méconnus.

Certain groupes de neurones du système nerveux central, particulièrement l'hypothalamus, intègre en permanence des signaux hormonaux et nerveux pour élaborer une réponse adaptative consistant dans le type de substrat (sucre ou lipide) utilisé par les tissus périphériques, mesuré par indirect calorimétrie.

En particulier, il a été démontré que l'absence d'une population de neurones (AgRP) projetant sur les structures nerveuses connectés aux tissus périphériques, conditionne l'utilisation des nutriments tels que dans les muscles, le pancréas, le tissu adipeux et l'activité du foie afin de favoriser l'utilisation des graisses en général et ainsi de promouvoir une résistance aux régimes enrichis.

Chez l'animal recevant une alimentation durant un horaire restreint, il est observé une résistance aux effets délétères d'un régime enrichi. Connaitre le moment exact où les neurones AgRP sont activés devient déterminant.

En utilisant une approche pharmacologique couplés à une technique permettant d'activer ou d'inactiver spécifiquement des neurones, nous visons à comprendre les mécanismes sous-jacents en modulant l'activité neuronale dans le temps et ses conséquences sur l'utilisation des nutriments au niveau périphérique.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen car nous regardons les relations inter-organes et l'utilisation des substrats énergétiques. Cette étude utilisera le minimum de souris nécessaire (114 souris génétiquement modifiée) et respectera le plus possible le bien être animal (raffinement des procédures par le biais d'analgésiques si nécessaire et amélioration de leur environnement par un enrichissement) pour être au plus proche des conditions physiologiques naturelles.

1974- La consommation de fructose est un facteur de risque bien connu pour le diabète, l'adiposité viscérale, la stéatose hépatique non alcoolique et la dérégulation de la prise alimentaire. Chez les individus consommant de grandes quantités de fructose, l'intestin est exposé à des concentrations élevées de fructose. Bien que de nombreuses études aient mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'hôte, les interactions entre le fructose et le microbiote intestinal

n'ont pas été étudiées. Ce projet testera l'hypothèse selon laquelle le fructose alimentaire pourrait modifier la composition du microbiote. De plus il déterminera si un déséquilibre de la flore intestinale par le fructose est impliqué dans la médiation de ses effets délétères sur la physiologie de l'hôte. L'intolérance au fructose affecte plus de 80% des enfants de moins de 2 ans et est également retrouvé chez les adultes sous forme bénigne ou sévère. Les symptômes associés à la malabsorption du fructose vont de la diarrhée et des douleurs abdominales à la dépression et l'anorexie. Même si la malabsorption des sucres est associée à la prolifération bactérienne, les mécanismes fondamentaux qui conduisent à ces symptômes n'ont jamais été étudiés dans le cadre du fructose.

L'ensemble des études préliminaires ayant été réalisées chez le rat, l'hypothèse du rôle du microbiote sera testée sur ce modèle. En revanche, l'étude des conséquences de la malabsorption du fructose sur le microbiote sera réalisée sur des souris transgéniques "intolérantes au fructose", modèle animal très adapté au sujet (deux souches seront utilisées). Des souris de souche sauvage constitueront des « contrôles ». A ce titre, la caractérisation initiale de leur réponse au fructose est indispensable. Si les souris répondent de la même façon que les rats, par la suite le nombre d'animaux utilisé sera réduit à l'utilisation seule de souris.

Notre projet nécessite l'utilisation de modèles animaux car les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte (identification des bactéries du tractus digestif sur- ou sous- représentées en présence de fructose et conséquences sur l'hôte de ces bactéries ou produits de leur métabolisme) que la culture d'organes séparés ne saurait reproduire. Le nombre d'animaux utilisés (au maximum 190 souris axéniques et 150 rats axéniques) est réduit au minimum possible sans nuire à la qualité statistique des données déterminée lors d'expériences préliminaires. Les animaux devant être hébergés en cage individuelle (pour une mesure précise de la prise alimentaire), leur milieu sera enrichi et ils seront hébergés dans des cages transparentes et ouvertes permettant une interaction visuelle, olfactive et auditive. Ils seront surveillés quotidiennement, et pesés trois fois par semaine.

Le traitement imposé aux animaux (changement de régime alimentaire) est indolore. Les régimes seront constitués au maximum de 40% de sucres (glucose, fructose ou amidon) ce qui est très proche des régimes standards contenant généralement 40-70% d'amidon. La présence de 40% de fructose dans les régimes n'entraîne pas de dysfonctionnement intestinal (douleur, diarrhée etc). Les volumes de gavage seront adaptés aux poids des animaux et celui-ci sera pratiqué par des expérimentateurs entraînés à la contention et au gavage. Les animaux seront habitués à être manipulés tous les jours durant la phase d'adaptation et de régime. Quelques gouttes de sang seront prélevées à la queue pour mesurer la glycémie aux temps 0, 30, 60, 90, 120 min après le gavage. A la fin de l'expérimentation le sang cardiaque sera prélevé après anesthésie.

1975- En dépit des efforts réalisés ces dernières années dans la validation de nouvelles cibles thérapeutiques, les échecs restent fréquents pour le traitement du cancer. Pour éviter ceci, il faut impérativement comprendre les mécanismes de résistances impliqués et tenter de développer des modèles précliniques plus pertinents.

Il existe donc aujourd'hui un consensus selon lequel l'amélioration de nos systèmes d'évaluations passent par la mise au point de modèles in vivo mieux caractérisés et plus proches des pathologies cancéreuses étudiées. Les greffes de tumeurs humaines chez la souris permettent de conserver les caractéristiques de celle-ci à la fois d'un point de vue histologique et moléculaire.

Les thérapies ciblées, médicaments qui bloquent des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses, ont connu un grand succès dans de multiples indications. Cependant, la cellule tumorale peut acquérir une résistance à ces thérapies et dans ce cas, la maladie progresse dans les 5-7 mois. La compréhension des mécanismes de résistance est donc d'un enjeu majeur. L'obtention de modèles in vivo est indispensable pour comprendre ces mécanismes et pour identifier de nouvelles stratégies capables de surmonter ces résistances.

Un projet clinique de 5 ans en cours a pour but d'étudier les mécanismes de résistance. A l'aide d'analyse génétique à haut débit nous étudierons sur une large cohorte de patient les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance. En plus de l'étude de ces mécanismes, l'objectif est de développer de modèles précliniques ayant acquis une résistance à une thérapie innovante. Ainsi, 250 tumeurs de patients seront xénotransplantées sur des souris immunodéprimées.

Nous avons prévu d'utiliser un maximum de 4600 souris pour le projet. Ce nombre est nécessaire du fait que le développement de modèles est un processus à plusieurs étapes: la greffe des tumeurs de 250 patients, l'établissement des modèles, la conservation de ces modèles en biobanque et décongélation.

Le développement de ces modèles va permettre une meilleure évaluation des molécules en préclinique et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés dans les évaluations précliniques dans le futur. De plus, la caractérisation moléculaire se fait directement sur les tumeurs de patients, de qui est aussi un point de réduction.

Nous prévoyons pour chaque modèle de développer des lignées cellulaires (point de réduction quand ceci réussit: voir ci-dessous). Des explorations fonctionnelles liées aux mécanismes de résistance et des tests pharmacologiques seront réalisés sur ces lignées, et donc in vitro. Les résultats ainsi obtenus permettront de sélectionner les médicaments à tester in vivo et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Pour le bien être animal (points de raffinement) nous utiliserons pour tout les actes pouvant engendrer un stress ou une douleur, des anesthésiques et des aliments adaptés en cas de problèmes mineurs liés à l'alimentation. Ces modèles générés constitueront des outils très important pour aider les chercheurs et les médecins à comprendre et lutter efficacement contre

1976- La peau est l'organe le plus grand de notre corps. Elle assure des fonctions essentielles de protection, thermorégulation, sécrétion et sensorielle. Ce tissu est en renouvellement permanent. Des cellules souches assurent ce renouvellement. En effet, les cellules souches sont capables de s'autorenouveler tout en régénérant l'hétérogénéité cellulaire d'un tissu. Dans la peau, un vaste répertoire de cellules souches a été identifié.

Il a été suggéré que les anomalies de ces cellules souches sont à la base de l'initiation et la propagation des tumeurs. L'échec des traitements anticancéreux aboutissant à la rechute résulterait en partie de l'incapacité de cibler ces cellules. Le mélanome cutané est un cancer agressif dérivé de mélanocytes. Des cellules avec un potentiel tumorigène accru ont été identifiées dans les mélanomes. Les mélanomes expriment des marqueurs de cellules souches.

La nestine est une protéine spécifique des cellules non différenciées. Elle est aussi détectée dans des tumeurs solides humaines. La nestine marque des cellules souches de la peau. A l'aide d'un modèle de rongeurs exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) pour le contrôle du promoteur du gène Nestin, il a été montré que les cellules Nestin+ sont multipotentes. En culture, ces cellules sont capables de produire des cellules neuronales, gliales, de muscle lisse, adipocytaires et mélanocytaires. Un nerf sciatique a été régénéré avec des cellules souches Nestin+ de peau.

Bien que la localisation et l'isolement de certaines de ces cellules soient possibles, l'étendue de l'apport de ces cellules Nestin+ dans la peau n'a pas été déterminée dans l'environnement naturel, in vivo. La possible relation entre les cellules dermiques et les mélanocytes du follicule pileux n'est pas connue. Leur possible relation aux cellules de mélanome n'a pas été analysée.

Nous avons caractérisé dans un modèle rongeur un marqueur cutané du lignage mélanocytaire. Il est exprimé par les cellules souches de mélanocytes, les mélanocytes matures et tumoraux. Les mélanocytes matures n'expriment pas Nestin. Dans un modèle qui développe des mélanomes cutanés, certaines cellules de mélanome sont Nestin+. Nous proposons d'étudier la descendance des cellules Nestin+ dans la peau normale et prédisposée au mélanome in vivo. Pour suivre la descendance d'une cellule dans l'organisme il est nécessaire de la marquer génétiquement. Nous utiliserons un système de traçage génétique à la fluorescence rouge et le marqueur de lignage mélanocytaire vert. Les cellules doublement marquées (jaunes) seront des cellules mélanocytaires descendantes des cellules Nestin+. La combinaison de 6 mutations pour faire ces expériences conditionne le nombre de rongeurs à produire à 4500 sur les 5 ans. Ce nombre est nécessaire pour obtenir des statistiques fiables. Les individus seront élevés dans un milieu enrichi par des igloos et soumis à un suivi clinique régulier pour déceler n'importe quel changement de leur état général. Dès apparition des premiers signes d'inconfort, ils seront mis en cages individuelles avec de l'aliment gélifié plus des antidouleurs et euthanasiés si leur état ne s'améliore pas en 24h. En fin de procédure les individus seront euthanasiés sans douleur et autopsiés pour utiliser les tissus entiers à analyser in situ ou bien isoler les cellules et faire des études in vitro. Le traçage génétique des cellules Nestin+ avec le rapporteur mélanocytaire devrait permettre d'établir l'implication des cellules Nestin+ dans l'initiation et la progression du mélanome. L'ablation génétique des cellules Nestin+ confirmera les résultats obtenus.

1977- Dans le cadre de certaines études réglementaires du médicament, certains protocoles nécessitent le suivi de la fertilité des animaux pour étudier les effets potentiels du produit sur la spermatogénèse. Pour cela, il est nécessaire d'avoir évalué la maturité sexuelle des animaux avant leur inclusion dans une étude de ce type.

L'électro-éjaculation, utilisée ici pour le *Macaca fascicularis*, est déjà pratiquée chez cette espèce dans d'autres laboratoires. Elle est classiquement décrite également chez l'homme à des fins d'insémination artificielle, notamment chez les tétraplégiques. Elle est également utilisée chez les félins en centres d'inséminations vétérinaires et chez les animaux de rente (taureaux). C'est une méthode efficace, rapide et assez facile, réalisée sous anesthésie générale. Le nombre d'animaux varie selon la demande en animaux matures par an (estimation 30).

1978- Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air,... . En principe sans danger pour l'homme, elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE vont aller se fixer sur un mastocyte, une cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, l'allergène va être reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte et ce dernier va relarguer son contenu induisant des symptômes cliniques.

Depuis le milieu des années 1950, de nombreuses publications mettent en évidence une association inverse entre allergie et cancer. Par exemple, une étude épidémiologique, réalisée aux Etats Unis en 2005, rapporte que les personnes atteintes d'asthme ou de rhinites allergiques ont un risque diminué de 20% de développer un cancer colorectal et 10% de développer tout autre type de cancer. Cette même étude révèle également que les personnes atteintes uniquement de rhinites allergiques développent moins de cancer du pancréas, et les personnes atteintes d'asthme développent moins de leucémie, de cancer du sein ou de cancer colo-rectal. L'ensemble de ces données suggère que les IgE participeraient à l'immuno-surveillance de l'organisme, processus par lequel le système immunitaire détecterait et détruirait toute cellule tumorale nouvellement formée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en étudiant le potentiel protecteur des IgE contre le cancer du sein dans un modèle de souris allergiques.

L'infidélité de transcription entraîne la production de protéines dites infidèles qui n'ont pas exactement la séquence prévue par les gènes qui les codent et ce, principalement chez les individus atteints d'un cancer. Récemment, nous avons montré que l'induction d'un cancer du sein chez la souris entraîne l'augmentation de la production d'anticorps dirigés contre un peptide infidèle, le « peptide A ».

Dans ce projet, des IgE produites par des souris allergiques et dirigées contre ce peptide, devraient être capables de déclencher une réaction cytotoxique contre les cellules cancéreuses. Le but est que cette réaction ciblée empêche l'évolution de la tumeur induite ou entraîne sa régression voire sa disparition.

Pour que cette étude soit statistiquement exploitable et significative, 6 groupes de 8 souris seront constitués. Dans un premier temps, les souris seront sensibilisées au peptide A et dans un second temps lorsque l'existence d'IgE contre ce peptide sera confirmée, l'induction d'un cancer du sein sera effectuée et nous pourrions évaluer le pouvoir « protecteur » des IgE anti-peptide A contre le cancer du sein.

Nos travaux portant sur le cancer du sein, nous n'utiliserons que des souris Balbc femelles âgées de 4 semaines au début de l'étude. Chez cette souche, l'injection de cellules 4T1 mime le cancer du sein humain. Dans le cas où un des points limites déterminés serait atteint, la souris serait mise à mort suivant une méthode réglementaire (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 48 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). L'utilisation de souris rendues allergiques est indispensable pour valider le fait qu'une allergie peut protéger d'un cancer (Remplacement). Les souris concernées seront mises à mort selon une méthode réglementaire à la fin de l'étude.

1979- L'oncologie interventionnelle avec ponction directe des tumeurs est en plein développement pour le diagnostic et le traitement des tumeurs et des métastases, notamment pulmonaires et abdominales. Les biopsies et ablations de tumeurs percutanées sont des procédures minimalement invasives guidées par l'image, pratiquées en routine clinique. Lors de la réalisation de ces ponctions, il existe un risque de traumatisme vasculaire iatrogène, par exemple des artères intercostales pour les procédures visant les poumons, le foie ou les reins. Dans le cas des artères intercostales, le risque iatrogène de saignement est responsable de 75% des saignements intercostaux nécessitant un traitement. Le risque d'une atteinte de la veine porte, du tronc cœliaque ou de l'artère mésentérique supérieure existe lors des procédures visant le pancréas. La prise en charge de ces lésions vasculaires consiste principalement en une procédure d'embolisation du vaisseau qui saigne, et/ou en une transfusion sanguine. Le prototype d'aiguille coaxiale développé doit permettre d'éviter des lésions vasculaires liées à la procédure percutanée (biopsie, ablation, infiltration). L'objectif de l'étude est d'évaluer la protection effectivement apportée par ce nouveau prototype en comparaison des aiguilles coaxiales utilisées cliniquement en pratique courante.

Le modèle animal utilisé est le Porc, et le nombre d'animaux prévus est de 5 au maximum.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : Il n'y a pas de méthodes de remplacement. Les simulations virtuelles ont été effectuées. Il n'existe pas d'objets tests permettant de reproduire l'anatomie et les propriétés physiologiques des vaisseaux en conditions physiologique, comme les artères intercostales, cœliaques et mésentériques, ni de la veine porte et de l'aorte in vivo. Le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car son anatomie vasculaire abdominale est similaire à celle de l'Homme.

- Réduction : l'étude se focalisera sur les artères et veines exposées à un risque lors de biopsies ou ablations percutanées de tumeurs d'organes intra-abdominaux tels que les poumons, le foie, les reins et le pancréas. Les tests du prototype et de l'aiguille coaxiale classique seront effectués sur les mêmes sujets afin de réduire le nombre d'expériences, chaque sujet sera son propre contrôle. Chaque sujet sera également utilisé pour les tests sur plusieurs artères/veines pour la même raison. Pour chaque site, le test sera répété entre 1 et 3 fois, en fonction de l'anatomie du sujet afin d'optimiser le nombre de mesures par sujet. Les animaux seront sacrifiés sans réveil par injection d'une dose létale de Chlorure de Potassium sous anesthésie générale. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori, les variabilités attendues étant inconnues. L'utilisation de 5 animaux (dont chaque modèle est son propre témoin) devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants.

- Raffinement : La procédure suit la pratique clinique humaine. Les aiguilles seront positionnées sous contrôle par imagerie temps réel, par échographie. La présence ou l'absence de lésion vasculaire due à l'aiguille sera vérifiée par angiogramme. En cas de saignement important, une injection de solution d'éponges de gélatine hémostatique sera effectuée afin d'arrêter l'hémorragie. Les tests seront successivement menés avec les aiguilles positionnées sur les artères intercostales, puis le tronc cœliaque, l'artère mésentérique supérieure et la veine porte. Le dernier test sera mené sur l'aorte, ce test présentant le risque le plus élevé pour l'animal. Il n'y aura pas de survie du sujet expérimental. Le stress pouvant être lié au déplacement de la cage à la plateforme d'imagerie sera contrôlé par une injection intramusculaire de ketamine (20mg/kg) + azaperone (2mg/kg) (Stresnil ; Janssen-Cilag, Belgium) 1 heure avant la procédure. En suite l'induction sera pratiquée avec injection intraveineuse de Propofol (3mg/kg) + pancuronium (0.2mg/kg). L'anesthésie sera maintenue avec de l'isoflurane 2%.

1980- L'anastomose est la connexion entre 2 parties du tube digestif effectuée après ablation d'une partie malade, pour pouvoir rétablir la continuité. La désunion de cette connexion est une complication redoutée qui peut être à l'origine de séquelles très graves chez le patient, pouvant aller jusqu'au décès. Cette désunion est malheureusement assez fréquente en chirurgie digestive, avec un taux de survenue pouvant atteindre 20%. Un facteur de crucial intervenant dans la cicatrisation de l'anastomose est le niveau de perfusion sanguine des 2 extrémités qui seront anastomosées. Une bonne perfusion assure l'oxygénation de cette connexion et permet une cicatrisation de bonne qualité. L'insufflation localisée de CO2 humidifié et chauffé, pourrait augmenter le niveau d'oxygénation des tissus. Un insufflateur de CO2 à flux laminaire a été développé (Fisher & Peckel) qui permettrait de conserver localement une atmosphère enrichie de CO2 humide et chaud.

En outre, l'application de laser (à des doses de 6J/cm²) pourrait augmenter de manière significative le niveau d'activité énergétique cellulaire (augmentation de la respiration mitochondriale). L'usage de procédés expérimentaux permet d'en démontrer le principe. Toutefois, les systèmes à usage peropératoire chirurgical doivent être développés. La société française MILTA technologies a mis au point Un système de laser thérapie adapté à l'usage intra opératoire, destiné actuellement uniquement à la chirurgie ouverte.

Le but de cette étude est de vérifier *in vivo* l'hypothèse que l'insufflation de CO₂ chaud et humide peut améliorer l'oxygénation anastomotique locale. Ensuite, il s'agit de vérifier que la combinaison de que l'insufflation de CO₂ chaud et humide en combinaison avec l'application de laser peut simultanément améliorer l'oxygénation anastomotique locale et stimuler l'activité mitochondriale et par cette action, améliorer la qualité d'une anastomose digestive.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Pour tester l'efficacité des dispositifs à l'étude d'obtenir une anastomose plus solide et moins inflammatoire, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le rat est un modèle de choix, pour : 1) la facilité de mise en œuvre des expérimentations et 2) le faible cout de gestion permettant de tester l'hypothèse sur un nombre suffisant de sujets.

Réduction : la richesse de littérature sur les anastomoses digestives chez le rongeur, permet de limiter le nombre d'animaux traités tout en conservant un échantillon d'effectif minimal mais suffisant pour obtenir des résultats exploitables.

Un total de 120 rats Wistar sera inclus dans le protocole. Les rats seront divisés en 10 groupes, de 12 animaux chacun, selon la technique utilisée pour réaliser l'anastomose digestive et la méthode de conditionnement.

L'abord sera réalisé par laparotomie dans des conditions d'asepsie chirurgicale. L'intestin est divisé et la continuité du tractus digestif est rétablie (selon le groupe) par une anastomose manuelle (avec un fil de suture) ou par la mise en place d'un système anastomotique par compression (un couple d'aimants).

Raffinement : les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

1981- Les techniques actuelles de remplacement de l'œsophage pour lésions bénignes ou cancéreuses consistent à utiliser l'estomac ou une partie du colon comme substitut. Ces techniques sont grevées d'une importante morbidité, conduisent à des résultats fonctionnels à long terme souvent imparfaits et nécessitent le remplacement de l'ensemble de l'œsophage même en cas de défaut de faible longueur. Enfin, l'échec par ces reconstructions conduit à une nutrition artificielle à vie.

Des études réalisées chez l'homme et dans des modèles animaux ont montré que l'ingénierie tissulaire représentait une alternative crédible à ces techniques. Les substituts utilisés étaient constitués d'une matrice, biologique ou synthétique,ensemencée de cellules épithéliales et/ou musculaires. Les cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) par leur potentiel de différenciation, leurs propriétés pro-angiogénique, immuno-modulatrice et anti-inflammatoire, constituent un outil thérapeutique prometteur dans ce domaine. Elles ont déjà été utilisées avec succès dans des modèles animaux évaluant la régénération médullaire, vésicale, myocardique et osseuse mais leur intérêt pour la régénération œsophagienne après remplacement circonférentiel reste à démontrer.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer le succès du remplacement circonférentiel de l'oesophage abdominal par une matrice biologique acellulaire (SIS – Small Intestinal Submucosa)ensemencée de CSM autologues.

Le succès est défini par la survie, sans apport nutritionnel autre qu'une alimentation orale, après ablation de l'endoprothèse à 3 mois.

L'objectif secondaire est de déterminer si l'adjonction de CSM contribue à la régénération tissulaire vers un phénotype œsophagien et d'en évaluer la cinétique.

Seule l'expérimentation *in vivo* permet de répondre à la question posée. Le mini-pig est un excellent modèle, fréquemment utilisé dans cette indication, du fait d'une anatomie et une physiologie proche de celle de l'homme. Nous avons par ailleurs nous-mêmes l'habitude de ce modèle sur lequel toutes nos expérimentations antérieures ont été menées.

Deux groupes d'animaux seront constitués. Les CSM seront isolées à partir d'une ponction de moelle osseuse de crête iliaque réalisée sur les animaux du groupe test. Après 14 jours d'amplification *in vitro*, les CSM seront ensemencées puis cultivées sur le SIS pendant 7 jours. Le substitut obtenu, ensemencé de CSM (groupe test) ou non (groupe témoin), sera tubulisé autour d'une endoprothèse œsophagienne extractible et implanté chirurgicalement dans le grand-épiploon de l'animal pour maturation *in vivo*. Après 14 jours, l'animal sera réopéré pour effectuer le remplacement circonférentiel de 5 cm d'œsophage abdominal par le substitut. La zone de greffe sera systématiquement protégée par l'endoprothèse œsophagienne pendant 3 mois.

En l'absence de complications, les animaux seront euthanasiés séquentiellement entre 3 et 12 mois. Une analyse structurelle histologique

et immunohistochimique des zones de greffe sera alors réalisée. Cette étude, prévue sur 3 ans, nécessitera au maximum 25 animaux.

Une analyse statistique a été utilisée afin d'estimer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs. Certains paramètres expérimentaux tels que le nombre de cellules à ensemencer et leurs durées de culture ont auparavant été mis au point *in vitro*. Les techniques opératoires ont déjà été évaluées lors d'expérimentations précédentes et lors de travaux de dissections, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Chaque étape de l'expérimentation sera réalisée sous anesthésie générale. Afin de réduire au maximum la souffrance de l'animal, des antalgiques seront systématiquement initiés en post opératoire. L'état général, l'apparence et le comportement de l'animal, révélateurs du niveau de douleurs, serviront à adapter secondairement la dose administrée. Par ailleurs, des points limites suffisamment prédictifs et précoces, motivant l'euthanasie anticipée de l'animal, ont été définis.

Les résultats de ce projet permettront de comprendre si les CSM jouent un rôle bénéfique pour la régénération œsophagienne. A terme, le remplacement œsophagien par de tels substituts pourrait permettre, tout en préservant les organes intra abdominaux, de régénérer *in vivo* un néo-œsophage fonctionnel, de longueur adaptée à la pathologie traitée.

1982- L'objectif du projet est de développer et d'évaluer des dérivés de la somatostatine marqués au gallium 68 (68Ga), utilisés en oncologie. La somatostatine est une hormone produite entre autres par les cellules neuroendocrines et qui possède des actions d'inhibition (inhibition du largage de l'hormone de croissance et de la TSH, suppression du largage des hormones gastro-intestinales...). Étant donné que la majorité des tumeurs neuroendocrines expriment les récepteurs à la somatostatine, il est possible d'utiliser la somatostatine et ses analogues pour cibler ce type de cancer. Ce projet sera mené en partenariat avec le cyclotron d'Afrique du Sud qui est l'un des 4 fournisseurs mondiaux de générateurs 68Ge/68Ga et possède une expertise dans l'utilisation du 68Ga pour le marquage de peptides.

De part ses propriétés, le 68Ga promet d'être le radionucléide le plus employé en imagerie TEP. Plusieurs dérivés marqués au 68Ga de la somatostatine ont été identifiés pour le diagnostic de tumeurs neuroendocrines mais les études concernant ces radiopharmaceutiques ne sont pas encore assez avancées pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (manque d'études couvrant l'optimisation en conditions BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) des techniques de radiomarquages, des études précliniques et cliniques).

L'objectif est de réaliser les évaluations biologiques de ces composés grâce à l'utilisation du microTEP/CT avant de pouvoir ensuite débiter la validation des études cliniques. Nous devons travailler *in vivo* pour reproduire l'ensemble du processus cancéreux.

Nous utilisons un modèle préclinique de cancérologie : injection de cellules tumorales de pancréas chez des souris immunodéficientes. Un total de 18 souris sera utilisé dans ce projet. La première procédure évaluera la biodistribution de l'ensemble des radiotraceurs grâce à l'imagerie de trois lots de souris ayant reçu des cellules tumorales en injection. Cette première procédure permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés en procédure 2, qui visera à effectuer les mesures de radiomarquage sur les radiotraceurs ayant montré une bonne fixation en procédure 1.

Une surveillance quotidienne sera effectuée sur les animaux, ainsi qu'une mesure de la taille des tumeurs induites. En accord avec les recommandations de bien être animal, les tumeurs ne dépasseront pas la valeur limite de 3000mm³, auquel cas les animaux seront écartés du protocole et euthanasiés. Les procédures expérimentales d'imagerie préclinique sont indolores. L'imageur possède un lit chauffant relié à un système d'anesthésie. Les durées d'acquisitions sont courtes.

1983- Les méningites sont une inflammation de la membrane enveloppant le cerveau, les méninges. Une proportion importante des méningites est d'origine bactérienne et l'organisme responsable de cette infection est le plus souvent *Neisseria meningitidis* (Meningocoques) dont il existe plusieurs sérogroupes (A, B, C, W135, X, Y...). La méningite est une pathologie grave qu'il est important de diagnostiquer rapidement afin de mettre en place au plus tôt le traitement approprié.

La technique conventionnelle pour l'identification est la culture. Cette technique qui, est essentielle pour la confirmation du diagnostic et la détermination de l'antibiogramme, est lente et peut conduire, si l'échantillon a été transporté et conservé dans des conditions inadaptées, à des résultats faussement négatifs.

Les techniques immunologiques de détection dans les fluides biologiques (LCR, sérum...) d'antigènes provenant des organismes infectieux permettent un diagnostic beaucoup plus rapide.

C'est pour ces raisons que nous souhaitons développer un test immuno-chromatographique permettant la détection des Méningocoques dans le liquide céphalo rachidien (LCR). Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps très sensibles. De tels anticorps ne sont pas commercialement disponibles.

De nombreux essais d'immunisation réalisés pour l'obtention d'anticorps monoclonaux n'ont pas permis d'obtenir des anticorps répondant à nos besoins, pour cette raison, les anticorps polyclonaux représentent une solution alternative. De plus les anticorps polyclonaux sont connus et utilisés pour apporter une sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux.

C'est dans ce contexte que nous soumettons ce protocole pour approbation. Ce protocole conduira à l'obtention d'un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, les immunogènes et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible.

Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 3 ou 5 lapins. Le nombre total de lapins immunisés pour développer des anticorps contre les différents sérogroupes sera au maximum de 40.

Ces animaux permettront de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums étant considérés comme stock patrimoine dans notre société, c'est à dire sans date d'expiration.

1984- 1-Objectif scientifique du projet:

Le pancréas est un organe mixte assurant une fonction exocrine impliquée dans la digestion et une fonction endocrine impliquée dans le métabolisme du glucose. La grande majorité des tumeurs pancréatiques (~80%) est représentée par des adénocarcinomes.

Aucun traitement disponible à ce jour ne parvient à éradiquer la maladie (le taux de survie à 5 ans n'est que de 5%). Pourtant l'adénocarcinome du pancréas est estimé comme la 2^e cause de mort par le cancer d'ici 2020. La compréhension des mécanismes pro-tumoraux est donc indispensable.

Le TGFβ est une cible thérapeutique intéressante dans le cancer du pancréas et est présente depuis l'initiation de la tumorigénèse correspondant à une inflammation du pancréas. Cependant son mécanisme d'action au cours des différentes étapes de la carcinogénèse pancréatique est mal connu. Dans ces conditions l'essai de molécules thérapeutiques visant à cibler le TGFβ est difficile à mettre en place.

Ainsi notre objectif est de tester l'effet du TGFβ sur les cellules tumorales pancréatiques, dans un contexte inflammatoire.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

L'adénocarcinome du pancréas est une tumeur solide très agressive représentant la 5ème cause de mortalité par cancer et résistante à tous les traitements conventionnels.

La moitié des patients décède moins de six mois après le diagnostic.

La caractérisation de nouveaux mécanismes pro-tumoraux pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas représente donc un réel enjeu clinique pour les années à venir.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Seul un modèle murin transgénique peut permettre de tester in vivo l'effet du TGF β sur le développement des lésions précancéreuses pancréatiques autochtones.

Le modèle murin que nous avons choisi pour réaliser cette étude reproduit parfaitement la pathologie humaine puisque c'est i) l'introduction d'une mutation retrouvée dans plus de 90% des patients atteints de cancer du pancréas qui induit la formation des lésions précancéreuses chez la souris (KrasG12D) et ii) l'activation dans les cellules tumorales de la voie du TGF β , molécule très fortement exprimée dans l'adénocarcinome du pancréas chez l'homme.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats, avec notamment la mise en place d'une étude « pilote ». Deux facteurs objectifs seront pris en compte : 1) Le nombre de lésions précancéreuses par unité de surface de pancréas; 2) Les proportions des lésions de chaque grade.

A l'instar de ce qui est observé chez l'Homme, les lésions précancéreuses pancréatiques, se développant chez les souris génétiquement modifiées, sont microscopiques et asymptomatiques. Toutefois, une attention particulière sera apportée à l'éventuelle apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance animale (pesée 2 fois par semaine). Le cas échéant, les dispositions adéquates préalablement établies seront immédiatement mises en application (analgésie ou mise à mort).

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 368 souris seront utilisées.

1985- La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence chez les personnes âgées. Avec l'allongement de l'espérance de vie, son incidence ne cesse d'augmenter. La maladie d'Alzheimer est une maladie vraiment dévastatrice, autant pour ceux qui en souffrent que pour leur familles et extrêmement coûteuse pour la société, la maladie d'Alzheimer est devenue une priorité de santé publique mondiale. Les causes de la maladie d'Alzheimer demeurent incomprises et aucun traitement efficace n'est encore disponible. Les facteurs de risques cardiovasculaires, au premier rang desquels l'hypertension artérielle (HTA), augmentent le risque de développer la maladie d'Alzheimer. De plus, des anomalies des vaisseaux cérébraux sont fréquemment observées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Notre équipe a montré précédemment que l'HTA est un facteur responsable de l'aggravation de la maladie d'Alzheimer. Nous avons également identifié une nouvelle cible impliquée dans l'atteinte de la circulation cérébrale par l'HTA et dans la maladie d'Alzheimer: le monoxyde d'azote (NO). Les objectifs du projet sont donc d'élucider le rôle de la voie de NO dans l'apparition et le développement de la maladie d'Alzheimer.

Le développement de la maladie d'Alzheimer est liée à la propriété unique de la protéine humaine, l'APP, à former des agrégats toxiques dans le cerveau. Pour modéliser cette maladie nous sommes amenés à utiliser les souris génétiquement modifiées possédant la protéine en question. C'est pourquoi nous utilisons pour les souris transgénique APPPS1, un modèle reconnu de la maladie d'Alzheimer. Les souris APPPS1 reproduisent partiellement la maladie d'Alzheimer ce qui n'affecte pas de façon significative la condition animale. Les conséquences de l'expression des transgènes humains ne sont pas létales (la durée de vie supérieure à 2 ans) et faiblement handicapantes. Ces souris seront rendues hypertendues par ingestion d'un produit hypertenseur, le L-NAME, qui bloque la production de NO et induit une hypertension modérée, sans provoquer les effets ou les souffrances secondaires connus. Pour distinguer le rôle du NO et de l'HTA, les souris seront traitées par de l'hydralazine (diluée dans l'eau de boisson), un traitement antihypertenseur d'utilisation clinique, n'agissant pas sur la voie du NO. Nous mènerons des études électro-physiologiques, comportementales, histologiques et biochimiques dans ce nouveau modèle expérimental permettant d'élucider le rôle du NO dans la maladie d'Alzheimer.

Les différents axes du projet impliquent 12 groupes de 5-10 souris, soit 100 souris au total, pour l'ensemble des protocoles expérimentaux pour une période de 3 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait que les résultats finaux que nous recherchons, y compris le ralentissement du déclin cognitif et une préservation de la mémoire et de la faculté d'apprentissage, ne peuvent être traités de manière adéquate que dans les expériences comportementales impliquant les vertébrés supérieurs. En outre, notre projet vise à comprendre la relation entre deux systèmes -nerveux et vasculaire - qui ne peut être établie que dans le contexte de l'organisme entier. Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre tient compte de l'état de l'art et de l'expérience antérieure de l'équipe : toutes les méthodes d'analyses envisagées sont pratiquées depuis plusieurs années, et sont parfaitement maîtrisées par les personnels en charge des études respectives. Toutes les mesures nécessaires sont prises pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Les procédures susceptibles de provoquer une douleur sont encadrées par l'usage d'un analgésique adapté (buprénorphine). Les animaux font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu.

Nous attendons que ces études aident à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer.

1986- Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales malignes les plus fréquentes chez l'adulte. Il n'existe pas de traitement permettant de guérir ces patients, et malgré l'efficacité partielle de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie, l'affection est souvent fatale en quelques mois.

Le but de ce projet est de maintenir des modèles tumoraux obtenus à partir de tumeurs issues de cancer humain. Les glioblastomes étant des tumeurs très hétérogènes, il est important d'entretenir les trois modèles disponibles.

Ce type de modèle est primordial car il évite les artéfacts de la culture in vitro. De plus, ils sont très proches de la pathologie humaine puisque la différenciation cellulaire, la morphologie et l'architecture de la tumeur initiale sont conservées. Ces modèles sont à la disposition des chercheurs pour l'étude de nouvelles molécules thérapeutiques candidates.

Pour chaque procédure, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire au maintien des modèles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent de réduire au maximum leur souffrance.

Deux des trois modèles sont porteurs du "Lactate Dehydrogenase Virus" les tumeurs seront implantés chez le rat, car ce dernier a la capacité d'éliminer ce virus. Au maximum, 18 rats seront nécessaires. Ce virus est éliminé pour deux raisons : 1) au cours de l'expérimentation il peut interagir avec le système immunitaire et peut amener des biais expérimentaux, 2) le statut sanitaire de l'animalerie n'admet pas la présence de ce virus.

Le laboratoire disposera de trois modèles dont les caractéristiques sont différentes. Pour chaque modèle, 12 passages sur 2 souris par an sont nécessaires, soient 24 souris greffées. Pour 3 modèles, 72 souris seront greffées par an. La demande étant faite pour 5 ans, 360 souris seront greffées.

1987- L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux produits antiparasitaires (ou parasitocides) vétérinaires afin d'améliorer la santé des animaux de compagnie (chiens, chats, chevaux) et des animaux destinés aux marchés alimentaires (bovins, ovins, caprins, poules, porcs).

Pour mener à bien le développement de ces nouveaux produits, l'innocuité et l'efficacité seront évaluées sur les espèces cibles conformément aux exigences réglementaires, dont les principales sont décrites dans les directives WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology), VICH (Veterinary International Conference on Harmonization) et EMA (European Medicines Agency).

Afin de réduire au maximum l'utilisation de l'animal, une première sélection de molécules parasitocides sera effectuée in vitro, par contact direct avec des parasites semblables aux parasites affectant les animaux cibles.

Une seconde étape de sélection peut être effectuée in vivo sur des rongeurs porteurs de parasites identiques à ceux de l'espèce cible, afin d'affiner la sélection et ainsi réduire le nombre d'animaux cibles utilisés au final. Une telle étude sera menée sur 4 à 5 rongeurs par groupe, avec typiquement 4 à 5 groupes par étude. Aucune douleur, souffrance ou angoisse n'est attendue ni tolérée.

Finalement, l'innocuité et l'efficacité du produit sélectionné seront évaluées chez l'animal cible dans le cadre d'études réglementaires.

Les études d'innocuité requièrent 2 à 4 groupes de 8 animaux. Des effets secondaires sont possibles à haute dose (plafonnée à 5X). Afin de réduire au maximum les troubles, les animaux sont suivis plusieurs fois par jour par les mêmes opérateurs hautement qualifiés dans les soins à l'espèce traitée. Les soins vétérinaires sont autorisés.

Le développement de tout produit qui provoquerait des effets secondaires modérés sera stoppé dès les premiers signes.

Les études d'efficacité, sont basées sur des comparaisons de niveaux d'infestation chez des animaux traités et non traités (groupe contrôle).

Les réglementations imposent pour le groupe contrôle un minimum de 6 animaux avec un niveau d'infestation défini. De ce fait, le nombre d'animaux utilisés (6 à 12) dans chaque groupe est lié à la probabilité d'obtenir ce niveau d'infestation, qui dépend du parasite étudié. Les connaissances de modèles animaux (études précédentes) et la littérature scientifique permettent d'évaluer cette probabilité.

Pour les études ectoparasites (parasites externes), les infestations peuvent parfois provoquer de l'inconfort chez l'animal du groupe contrôle (démangeaisons, dermatite). Un examen sanitaire régulier des animaux sera pratiqué. Le retrait de l'étude ou un traitement concomitant durant l'étude sera effectué.

Pour les études endoparasites (parasites internes), les symptômes dus aux infestations sont très rares car les animaux sont parasités sur une période courte durant laquelle les symptômes n'ont pas le temps d'apparaître (en conditions naturelles les parasites internes provoquent parfois des symptômes cliniques en conditions chroniques, quand l'hôte est parasité depuis longtemps).

Sur l'ensemble du projet et sur une durée de 5 ans, jusqu'à 400 rongeurs, 900 chiens, 900 chats, 180 chevaux, 180 ovins, 180 bovins, 180 caprins, 180 porcs, 180 poules pourront être utilisés en fonction des produits antiparasitaires à développer.

1988- Du tissu adipeux brun fonctionnel a été détecté récemment chez l'Homme adulte sain où il est activé en réponse au froid. Ce tissu utilise des lipides et des sucres pour réaliser de la thermogénèse. L'augmentation de son activité est une option thérapeutique réelle pour le traitement de l'obésité. Malheureusement, ce tissu adipeux brun est quasi-absent chez les patients obèses. L'option thérapeutique consisterait donc à favoriser la formation d'adipocytes « BRITE » qui sont des adipocytes bruns se formant au sein du tissu adipeux blanc. Cela aura l'avantage de mettre à profit la masse importante de ce tissu dans lequel cet événement prend place. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les facteurs permettant la formation et l'activation de ces adipocytes brites chez l'homme.

Notre équipe a développé un modèle unique d'étude in vitro des adipocytes brites à partir de cellules humaines. Nous avons ainsi pu identifier de nombreuses cibles dont deux microARNs très intéressants qui contrôlent la formation des adipocytes brites. Ces microARNs sont de petites séquences ARNs permettant d'inhiber la traduction de certains ARNm et pourrait devenir de nouvelles cibles thérapeutiques permettant l'augmentation de la dépense énergétique chez les patients obèses. Toutes les approches réalisables in vitro ont été menées chez l'homme et la souris et ont permis l'obtention de données essentielles à l'avancée des projets comme la faisabilité et l'identification des mécanismes impliqués, sans passer par l'expérimentation animale.

Notre objectif est maintenant de déterminer si les effets identifiés in vitro sont transposable in vivo. Pour cela nous réaliserons une petite incision sous anesthésie, qui nous permettra de voir les tissus adipeux, et nous injecterons directement dans le tissu adipeux blanc sous-cutané de souris soit des microARNs, soit des inhibiteurs de ces microARNs et déterminerons leurs effets sur la formation et l'activation des adipocytes brites. Pour cela, les animaux seront soumis à des conditions où les adipocytes brites vont être stimulés (exposition au froid, traitement beta adrénergiques) ou à des conditions d'obésité (régime riche en graisse) afin de déterminer respectivement les effets inhibiteurs ou activateurs de ces microARNs. L'ensemble des procédures utilisées a déjà été mis au point et validé sur ce modèle de souris, les expériences seront toutes réalisées dans des armoires climatisées et dans des cages avec un milieu enrichi. Nous utiliserons pour l'ensemble des procédures 912 souris sur 5 ans.

1989- Ces travaux pratiques constituent les parties pratiques des formations spécialisées en expérimentation animale : formation A et formation B. Ces formations ciblent en particulier la connaissance des modèles de rats et souris. Elles ont reçu un avis favorable de la Commission Nationale de l'Expérimentation Animale et sont reconnues par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (agrément ministériel délivré pour chacune). La formation A s'adresse à toute personne devant appliquer des procédures expérimentales aux animaux, la formation B aux personnels concevant des procédures expérimentales et des projets.

Les objectifs de ces TP sont :

- initier les participants à la manipulation de rat et souris
- illustrer les concepts fondamentaux abordés en cours : prise en compte de l'animal comme être sensible, règle des 3Rs, éthologie, points limites, anesthésie, méthodes de mise à mort, anatomie/physiologie,
- apprentissage des gestes techniques de base et mise en pratique des notions éthiques de base de l'expérimentation animale sur modèles de rat et souris.
- s'assurer que les personnes suivant ces formations aient les connaissances pratiques nécessaires pour réaliser/participer à des expérimentations animales dans le respect des textes en vigueur.

Dans un souci de Remplacement, le modèle de rat ne sera présenté que sous forme de vidéo/photos et avec des mannequins de rat conçus pour présenter d'une part les caractéristiques anatomiques de ce rongeur d'autre part pour réaliser des gestes de base. Le nombre de souris utilisées a été calculé au plus juste pour satisfaire à la fois à la nécessité de réduction et à l'exigence d'une formation de qualité (3 souris/participant, 24 participants/session, 3 sessions par an soit 1080 souris sur 5 ans). De plus, la chronologie des manipulations à enseigner sur les souris est définie de sorte que la procédure soit sans réveil afin de s'affranchir de toute souffrance inhérente à l'inexpérience des étudiants.

Dans l'optique de Réduire/Raffiner tout geste/attitude permettant de s'affranchir ou le cas échéant de limiter au maximum souffrance, stress ou inconfort de l'animal, sera mis en exergue. Les modalités de mise en place et de suivi d'une anesthésie de courte durée seront particulièrement détaillées afin de sensibiliser les futurs expérimentateurs à ces méthodes de raffinement expérimental indispensables dans le domaine. Un encadrant est prévu pour quatre étudiants afin de dispenser un enseignement aussi personnalisé que possible et donc une surveillance rapprochée de chaque animal.

1990- A l'échelle de la planète, plus de 300 millions de personnes sont chroniquement infectées par le virus de l'hépatite B (VHB) avec le risque d'évolution vers la cirrhose et le cancer du foie. Ainsi le cancer du foie due au virus de l'hépatite B est le cinquième cancer par ordre de fréquence et à la 10ème place des causes de mortalité. Il s'agit donc d'un problème majeur de santé publique malgré un vaccin efficace et bien toléré. Ces personnes chroniquement porteuses du virus ont été infectées avant que le vaccin ne soit disponible ou qu'il ne leur soit proposé. Les polémiques autour du vaccin contribuent encore à la faible acceptation du vaccin, surtout en France. Ceci se traduit par un taux trop faible de protection de la population qui reste donc à risque d'être infectée par le virus.

Les traitements actuels de l'hépatite B reposent sur les interférons de type I ou sur les inhibiteurs de la polymérase virale. Les traitements permettent au mieux et dans un faible pourcentage de cas une « cure fonctionnelle » qui est caractérisée par le contrôle de la réplication virale par le système immunitaire de la personne infectée. Même dans ces cas, le virus persiste dans le foie avec des réactivations agressives en cas de traitements immunosuppresseurs ou anti-cancéreux. Si les traitements à base d'interféron permettent cette cure fonctionnelle pour environ 30% des patients qui peuvent recevoir ce traitement, c'est au prix d'un traitement long, d'au moins une année, et mal toléré. Si les traitements par les inhibiteurs de la polymérase virale sont mieux tolérés et répriment efficacement la réplication virale, la cure fonctionnelle n'est obtenue que très rarement. Ces traitements doivent être poursuivis sur le long terme ; en effet l'arrêt de ces inhibiteurs est sanctionné par une reprise de la réplication virale dans la grande majorité des cas.

Il existe donc un besoin pressant de nouveaux traitements mieux tolérés et plus courts, induisant a minima une cure fonctionnelle et idéalement une éradication du virus du réservoir hépatique. Notre équipe a identifié le récepteur nucléaire "FXR", le récepteur des sels biliaires, comme un facteur important de la régulation de la réplication du VHB. Les agonistes de

FXR répriment de façon doses dépendantes la synthèse des ARNm et des protéines virales ainsi que la sécrétion de virions. Ces résultats ont été obtenus avec les modèles cellulaires qui permettent l'étude d'un cycle complet de réplication du virus après infection avec des virions infectieux. Il s'agit de la lignée HepaRG différenciée par culture en milieu défini et de culture d'hépatocytes primaires humains. Les agonistes de FXR sont potentiellement intéressants comme molécules thérapeutiques du fait de leur bonne tolérance et des effets bénéfiques qu'ils ont déjà montré sur les fonctions hépatiques et sur la réduction de la fibrose dans les essais cliniques de phase II dans la stéatose hépatique non alcoolique et la cirrhose biliaire primitive chez l'homme.

Les possibilités thérapeutiques des agonistes de FXR pour l'hépatite B incitent à explorer leurs effets sur la réplication du VHB dans des modèles animaux avant de passer chez l'homme. Il a été développé récemment un modèle de souris dites chimériques puisque leur foie est constitué d'hépatocytes murins et humains. Ces souris peuvent être infectées par les virus humains hépatotropes, virus des hépatites B et C notamment. Ce modèle peut fournir un support intéressant pour tester les effets de molécules antivirales indirectes puisque les cellules infectées par le VHB sont les hépatocytes humains implantés dans le foie de la souris. Ces hépatocytes humains expriment donc les protéines ciblées par cette approche et notamment le récepteur humain nucléaire "FXR". Il devrait donc être possible d'étudier leurs effets sur la réplication du virus de l'hépatite B. Le nombre d'animaux utilisés par groupe expérimental dans ce projet suivra l'esprit de la règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement). Ainsi, le nombre de souris utilisé dans ce projet a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en minimisant leur nombre.

Tout au long des expériences, nous veillerons au bien être des animaux et à réduire au maximum la souffrance ou l'angoisse des souris. Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 836 souris.

1991- L'Observatoire National des Anomalies Bovines permet de détecter dans les races bovines françaises les anomalies génétiques. Ces anomalies sont généralement repérées chez les veaux peu de temps après la naissance.

En 2009, une nouvelle anomalie a ainsi été décrite en race Rouge-des-Prés : le syndrome des « veaux tourneurs ». Il s'agit d'une anomalie neurodégénérative, qui se déclare dans les premières semaines après la naissance. Elle provoque une faiblesse et une incoordination des pattes arrière, s'accroissant dans les mois qui suivent. La mutation à l'origine de cette anomalie a été identifiée chez le bovin, ce qui a ainsi permis de mettre à disposition des éleveurs un test de dépistage pour l'éradiquer.

La fonction du gène impliqué est encore inconnue à ce jour. Par ailleurs, au vu des symptômes chez les veaux atteints, il semblerait que des mutations affectant ce même gène soient à l'origine de pathologies humaines similaires : il existe également des anomalies neurodégénératives précoces chez l'homme, avec des symptômes dès les premières années de vie.

La compréhension du rôle de ce gène au cours du développement, de la maturation et du fonctionnement du système nerveux présente donc un fort intérêt pour l'élevage mais aussi pour la santé humaine. L'objectif de ce projet est ainsi de mieux comprendre la fonction du gène impliqué dans le syndrome bovin, ainsi que les mécanismes responsables de la dégénérescence nerveuse.

Les études sur l'espèce bovine sont longues et difficiles car elles nécessitent le maintien coûteux d'animaux porteurs de la mutation dans les unités expérimentales, sont dépendantes des caractéristiques physiologiques de l'espèce bovine (long intervalle de génération, faible prolificité,...) et du manque d'outils d'analyse adaptés à cette espèce pour ce type d'expérimentation. La modélisation de cette pathologie sur modèle souris a donc été entreprise (durée de gestation beaucoup plus courte, avec une taille moyenne des portées plus élevée...) et la création de lignées transgéniques mimant la pathologie bovine a été réalisée afin de caractériser plus finement leur phénotype.

Sur ces lignées transgéniques seront analysés différents paramètres :

- La reproduction (taille des portées, taux de résorption indiquant éventuellement un défaut de développement embryonnaire...)

- Les défauts de fonctionnement du système nerveux (anomalies de coordination touchant notamment la locomotion...),

- Les paramètres sanguins pour identifier une éventuelle anomalie du métabolisme général.

Ces nouveaux modèles animaux pourraient permettre de comprendre le rôle du gène impliqué, non seulement dans le tissu nerveux, mais aussi dans d'autres organes où il est exprimé. L'utilisation de la souris comme animal modèle est de fait particulièrement pertinente pour étudier l'ensemble de ces tissus et la fonction du gène au cours du développement. Au total, ce projet utilisera environ 1080 souris sur 5 ans, nombre nécessaire et suffisant pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables à l'aide de protocoles expérimentaux spécialement adaptés (utilisation d'un fond génétique pur, de croisements raisonnés, analyses phénotypiques pluritissulaires, ..). Les animaux seront étroitement surveillés pour s'assurer de leur bien être et les protocoles expérimentaux utilisés ont été choisis pour éviter toute souffrance. Le nombre d'intervention sur animal a été réduit au minimum et des protocoles d'anesthésie et d'analgésie déjà validés sur ces animaux de laboratoire sont utilisés.

1992- Parmi les cancers cutanés, le mélanome représente en France comme dans la plupart des pays occidentaux, un problème important de santé publique avec un pronostic extrêmement péjoratif pour les formes métastatiques. Il est important de mettre en place des programmes de recherche ayant pour but de tirer partie des données de la recherche fondamentale pour mieux comprendre cette pathologie et identifier de nouvelles cibles cellulaires qui permettraient d'améliorer le pronostic et/ou le traitement du mélanome. MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) est un facteur de transcription impliqué dans la pathogénie du mélanome. Nous avons récemment identifié une mutation de MITF (Mi-E318K) et montré que cette mutation prédispose au mélanome en stimulant les propriétés migratoires et invasives des cellules. Afin d'étudier dans un contexte plus physiopathologique l'effet de cette mutation dans la progression tumorale, nous avons créé, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris, un modèle de souris C57Bl6 exprimant la forme mutée

endogène de MITF. Ce modèle est étudié au laboratoire depuis 2011. Le mélanome est une maladie complexe et les nombreux modèles animaux de développement de mélanome montrent qu'une seule altération génique ne suffit pas à induire un mélanome chez la souris. Les mutations activatrices de BRAF (BRA^{FV600E}), de NRAS (NRAS^{Q61K}) et l'inactivation de PTEN constituent les principales altérations géniques retrouvées chez l'homme. Les souris Mi-E318K seront donc croisées avec des modèles de souris bien décrits susceptibles de développer des mélanomes de type Tyr::CRE(ERT2)BRA^{FV600E}/PTEN^F/F (ce modèle ne présente pas de phénotype constitutif dommageable) et Tyr::NRAS^{Q61K} (ces souris présentent une hyperkératose de la peau et ne développent pas de phénotype particulier de manière constitutive). Ces différents modèles permettront de déterminer si la mutation Mi-E318K modifie la latence et la pénétrance du développement des mélanomes dans ces modèles. De plus, nous réaliserons des expériences de xénogreffes de cellules humaines exprimant de façon stable MITF sauvage ou Mi-E318K chez la souris nude. Il s'agit de modèles de cellules dans lesquels nous avons observé que l'expression de Mi-E318K stimule les propriétés tumorales in vitro. Les souris nude ont un système immunitaire très faible, nous pourrions alors injecter des cellules humaines de mélanomes sans risque de rejet. Il s'agit là d'une autre manière d'étudier la tumorigenicité du mutant de MITF in vivo.

Ce projet permettra de mieux comprendre le rôle de la mutation Mi-E318K dans le développement du mélanome et donc de mieux comprendre les événements clés dans le développement de cette tumeur extrêmement agressive. Ces modèles nous permettront également d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels Mi-E318K exerce ses effets.

Nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint permettant l'analyse statistique des résultats.

Tous les demandeurs sont titulaires d'une formation B. Les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

Nous utiliserons un total 258 animaux dans ce projet.

1993- L'Ifosfamide (IFO) ou le cyclophosphamide (CPM), sont des composés antitumoraux faisant partie de la classe des alkylants de l'ADN. Le CPM est connu et utilisé pour ses propriétés modulant la réponse immunitaire qui ont largement été démontrées au cours de la dernière décennie. En effet, à faible dose il régule positivement le système immunitaire et favorise ainsi l'élimination des cellules tumorales. De plus, cet intérêt est appuyé par l'effervescence de l'immunologie dans le domaine du cancer. En effet, le cancer échapperait à la surveillance immunitaire par plusieurs processus et par conséquent le système immunitaire serait inefficace dans son rôle de défense.

Actuellement, très peu de publications impliquent l'IFO dans la régulation du système immunitaire. De ce fait, et étant donné qu'il possède une structure semblable celle du CPM, nous souhaiterions étudier le potentiel effet sur la modulation du système immunitaire. Des résultats antérieurs ont montré que l'IFO aurait bien une activité de régulation sur le système immunitaire qui est proportionnelle à la dose administrée. De plus, nous avons développé de nouveaux composés dérivés de l'IFO et souhaiterions aussi étudier l'effet d'un de ces dérivés : le géranyloxy-ifosfamide (G-IFO). Cette étude sera effectuée en comparaison avec le CPM sur des souris possédant un système immunitaire entier ou altéré, porteuses ou non de tumeurs, dans le but d'étudier le potentiel rôle de l'environnement tumoral dans la régulation du système immunitaire.

L'influence de la diversité des cellules impliquées dans l'immunité, nous oblige à travailler sur un modèle in vivo, modèle largement utilisé dans le domaine de l'immunologie et de la cancérologie puisqu'il n'existe pas de méthode alternative traduisant fidèlement le système immunitaire dans sa globalité. La quantité de souris nécessaire à cette étude a été déterminée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux et permettant d'obtenir des résultats statistiquement viables via des tests non paramétriques. L'ensemble des procédures sera réalisé de façon à éviter tout stress et toute douleur à l'animal. De plus, une observation, une pesée (et une mesure des tumeurs dans le cas de souris porteuses de tumeurs) seront menées trois fois par semaine afin de prévoir et de diagnostiquer au plus tôt les points limites et les critères d'interruptions. Ainsi, le nombre total de souris utilisé dans ce projet a été évalué à 822 souris.

1994- En cancérologie, un des enjeux majeurs en imagerie concerne le diagnostic précoce et spécifique des tumeurs pour améliorer la prise en charge et le traitement de la maladie. Les axes de recherche actuels s'orientent vers le développement d'agents de contraste spécifiques : un anticorps reconnu par la tumeur est couplé à l'agent pour le diriger spécifiquement vers la tumeur. Ainsi, la lésion sera plus contrastée sur l'image et sera mieux différenciée du milieu environnant.

Cette stratégie adoptée par les industriels du médicament est plus ou moins aboutie suivant le type d'agent considéré (échographique, IRM, PET...) et plus précisément suivant ses propriétés physicochimiques permettant un couplage stable avec un anticorps et suffisamment performant pour être détecté en clinique. Parmi ces techniques d'imagerie, l'imagerie photonique offre un large panel de fluorophores, facilement fonctionnalisables avec des anticorps et exploitables pour l'imagerie in vivo. L'objectif du présent projet est d'évaluer des biomarqueurs dirigés vers des tumeurs hormono-dépendantes (cancer du sein principalement) développés par un industriel : il s'agira de tester puis sélectionner le ou les biomarqueurs les plus pertinents pour une détection optimale des tumeurs.

Ces agents étant dirigés vers des sites tumoraux (cellulaires et/ou vasculaires) doivent donc être évalués in vivo pour avoir une expression réaliste des sites de fixation. L'expression de ces sites résultant d'une cascade d'interactions cellulaires/moléculaires dans la tumeur ne peuvent être simulés ni reproduits sur cultures cellulaires ou organoïdes. Il n'est pas possible également d'élaborer des fantômes de réseaux vasculaires identiques (en terme de taille et de tortuosité de vaisseaux) à celui d'une tumeur in vivo. Or, la diffusion des biomarqueurs étudiés est directement liée à l'hémodynamique tumorale. Il est donc indispensable que le protocole soit conduit sur un modèle présentant les mêmes caractéristiques biologiques que les tumeurs des patients. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux développant des tumeurs orthotopiques est incontournable. De plus et afin de limiter le nombre d'animaux, seuls les biomarqueurs ayant prouvé un intérêt manifeste sur

cultures cellulaires seront inclus dans l'étude. Toujours dans l'optique de limiter le nombre d'animaux utilisés, deux greffes tumorales en contralatéral seront réalisées par souris ce qui permet de diviser par deux le nombre d'animaux inclus. Enfin, toutes les procédures mises en œuvre dans ce projet ont par ailleurs été rédigées de sorte à minimiser les manipulations et ainsi le stress des animaux avec une surveillance quotidienne de leur état général. Cinq biomarqueurs seront évalués chaque année. Trois études successives seront réalisées pour déterminer la cinétique, la dose optimale et la spécificité de chaque biomarqueur. Pour se faire, 72 souris/biomarqueur seront incluses soit 1800 souris sur la totalité du projet.

1995- Notre projet de recherche a pour objectif de développer un vaccin thérapeutique efficace permettant de traiter les patients atteints de cancer de la peau, rare et agressif. Avec les traitements actuels (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) seuls 32% des patients ayant des carcinomes avec métastases ont une durée de vie supérieure à 2 ans. Nous souhaitons donc faire la preuve de concept d'un nouveau vaccin thérapeutique et pouvoir disposer dans 2 ans de données expérimentales suffisantes et nécessaires à une demande d'autorisation d'essai clinique.

Le vaccin thérapeutique que nous souhaitons développer repose sur l'utilisation d'un vecteur bactérien modifié permettant la production d'une protéine d'intérêt thérapeutique. Cette protéine sera délivrée par le vecteur dans les cellules de l'hôte vacciné. La bactérie utilisée ici exprime naturellement une seringue moléculaire. Cette seringue « embarquée » est capable d'injecter des protéines dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. Grâce à ce mécanisme et en modifiant ces bactéries, il est possible d'injecter dans des cellules cibles, des protéines d'intérêt telles que des antigènes tumoraux et induire une réponse anti-tumorale par le système immunitaire. Afin de réduire la dangerosité du vecteur bactérien envers l'hôte, nous avons également modifié cette bactérie afin qu'elle n'exprime plus deux toxines clés principalement responsable de sa virulence.

Ce projet de recherche a pour objectif d'évaluer l'efficacité du vaccin et de comprendre les réponses immunitaires induites, afin de traiter les patients atteints de cancers avancés. La preuve de concept de l'efficacité et de l'innocuité du vaccin sera effectuée dans un modèle thérapeutique, c'est à dire que les vaccinations sont réalisées suite à l'implantation tumorale.

Afin d'obtenir une autorisation d'essai clinique chez l'homme (Phase I), il est nécessaire de réunir suffisamment de données concernant l'efficacité et l'innocuité de notre vaccin in vivo.

C'est pourquoi, suite aux données obtenues in vitro, le modèle expérimentale chez la souris est primordiale et ne peut pas être remplacé. En effet, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests in vitro. D'autre part l'utilisation du modèle souris est imposée par son utilisation dans les tests pré-cliniques des compagnies pharmaceutiques.

Nous avons actuellement à notre disposition une grande quantité d'outils d'analyse nous permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. En effet, pour chaque procédure expérimentale, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre réduit d'animaux tout en essayant d'obtenir le maximum de résultats statistiquement interprétables. Les procédures expérimentales ainsi que les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage qui pourrait être ressenti par les animaux.

Le projet nécessitera l'utilisation de 444 souris au maximum.

1996- La formation des personnes impliquées dans l'expérimentation animale est particulièrement suivie et encadrée, à la fois par les instances réglementaires (Direction Départementale de la Protection des Populations) et par le responsable du suivi de la formation et des compétences de l'établissement utilisateur.

Les compétences des expérimentateurs doivent également être évaluées et validées.

Cependant, pour obtenir un bon niveau de compétence et une expertise technique, il est indispensable que le personnel puisse se former.

Le bon niveau de compétence du personnel est un élément majeur pour le respect de la règle des 3Rs:

- Réduire : une expertise dans les gestes techniques permet de ne pas recommencer les procédures expérimentales et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés.
- Raffiner : une bonne réalisation des gestes techniques permet de réduire au maximum l'inconfort de l'animal.

La formation est suivie en priorité par les nouveaux arrivants dans l'établissement, les personnes n'ayant pas manipulé depuis plusieurs mois, ainsi que les personnes souhaitant utiliser une nouvelle technique expérimentale, plus éthique et/ou mieux adaptée à son projet.

Le nombre d'animaux et les espèces utilisés sont adaptés à l'activité de l'établissement utilisateur (projet, nombre de personnels). C'est pourquoi, un maximum de 6 ovins, 6 caprins, 10 porcins, 15 volailles et 4 bovins sera utilisé pour la formation du personnel pendant la durée de ce projet (5 ans).

Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie réalisées par du personnel expérimenté. Toutes les dispositions seront prises pour améliorer le bien-être de l'animal dans la mesure où elles sont compatibles avec l'objectif de la procédure expérimentale. Par exemple, pour réduire le stress, le milieu d'hébergement sera enrichi (les animaux auront accès à des jouets comme des bidons en plastique pour les porcs, etc...)

1997- Les sérine-hydrolases constituent une large famille d'enzymes représentant environ 1% du génome humain. Des molécules thérapeutiques qui ciblent ces enzymes ont démontré leur efficacité clinique dans des indications allant du diabète au déficit de cognition. Notre partenaire a développé un nouveau composé qui cible des membres de la famille des sérine-hydrolases. Ce projet a pour but de tester les effets de ce composé sur les paramètres métaboliques de souris naïves C57BL/6N. Il utilisera un total de 30 animaux (10 souris traitées avec le nouveau composé ; 10 souris traitées avec une molécule de référence ; 10 souris non traitées). Si les résultats de ce 1er projet sont fructueux, ce composé pourra ainsi être le

point de départ du développement d'une nouvelle classe de composés thérapeutiques pour traiter de nombreuses pathologies métaboliques.

Ce projet fait suite à des évaluations *in vitro* de la molécule, permettant ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés pour satisfaire les exigences de réduction et de remplacement, tout en répondant aux exigences de raffinement des critères éthiques.

1998- Une allergie est une réaction exagérée du système immunitaire vis-à-vis d'un allergène qui peut être présent dans l'alimentation, dans l'air...en principe sans danger pour l'homme. Elle se présente sous différentes formes : digestives, cutanées, respiratoires.

Brièvement, la maladie allergique est divisée en 2 phases. Lors du premier contact avec un allergène, l'individu ne déclenche pas de réaction allergique mais produit des immunoglobulines (IgE) dirigées contre cet allergène. Ces IgE vont aller se fixer sur un mastocyte, une cellule contenant de nombreuses molécules, dont l'histamine. Lors du second contact avec cet allergène, l'allergène va être reconnu par les IgE fixées sur le mastocyte et ce dernier va relarguer son contenu induisant des symptômes cliniques.

Depuis le milieu des années 1950, de nombreuses publications mettent en évidence une association inverse entre allergie et cancer. Par exemple, une étude épidémiologique, réalisée aux Etats Unis en 2005, rapporte que les personnes atteintes d'asthme ou de rhinites allergiques ont un risque diminué de 20% de développer un cancer colorectal et 10% de développer tout autre type de cancer. Cette même étude révèle également que les personnes atteintes uniquement de rhinites allergiques développent moins de cancer du pancréas, et les personnes atteintes d'asthme développent moins de leucémie, de cancer du sein ou de cancer colo-rectal.

L'ensemble de ces données suggère que les IgE participeraient à l'immuno-surveillance de l'organisme, processus par lequel le système immunitaire détecterait et détruirait toute cellule tumorale nouvellement formée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse en étudiant le potentiel protecteur des IgE contre deux modèles de cancer du sein chez des souris allergiques à un lactosérum.

Pour cette étude 56 souris Balbc femelles seront utilisées et divisées en 6 groupes de 8 souris et 2 groupes de 4 souris. Elle sera composée de 2 phases, la seconde phase ne sera réalisée que si la première phase est concluante.

Les souris seront sensibilisées au lactosérum et ensuite lorsque l'existence d'IgE contre ce produit sera confirmée, l'induction d'un cancer du sein sera effectuée et nous pourrons évaluer le pouvoir « protecteur » des IgE anti-lactosérum contre ce cancer. Deux voies d'injections des cellules seront testées. Des cellules seront injectées par voie sous cutanée. Cette technique nous permet de suivre l'évolution du volume tumoral en fonction du temps. L'injection de telles cellules par voie intraveineuse permet d'obtenir des métastases. Nous souhaitons ici optimiser la quantité de cellules à injecter selon cette voie.

Une surveillance quotidienne des souris sera effectuée. Elles seront maintenues dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une hygrométrie de $55 \pm 20\%$. Elles disposeront de nourriture et d'eau *ad libitum*.

Nos travaux portant sur le cancer du sein, nous n'utiliserons que des souris Balbc femelles. Chez cette souche, l'injection de cellules 4T1 mime le cancer du sein humain (Raffinement). Notre étude statistique nous indique qu'utiliser 56 souris est nécessaire et suffisant (Réduction). L'utilisation de souris rendues allergiques est indispensable pour valider le fait qu'une allergie peut protéger d'un cancer (Remplacement). A la fin de l'étude, toutes les souris seront mises à mort selon une méthode réglementaire.

1999- La formation des personnes impliquées dans l'expérimentation animale est particulièrement suivie et encadrée, à la fois par les instances réglementaires (Direction Départementale de la Protection des Populations) et par le responsable du suivi de la formation et des compétences de l'établissement utilisateur.

Les compétences des expérimentateurs doivent également être évaluées et validées.

Cependant, pour obtenir un bon niveau de compétence et une expertise technique, il est indispensable que le personnel puisse se former.

Le bon niveau de compétence du personnel est un élément majeur pour le respect de la règle des 3Rs:

- Réduire : une expertise dans les gestes techniques permet de ne pas recommencer les procédures expérimentales et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés.

- Raffiner : une bonne réalisation des gestes techniques permet de réduire au maximum l'inconfort de l'animal.

La formation est suivie en priorité par les nouveaux arrivants dans l'établissement, les personnes n'ayant pas manipulé depuis plusieurs mois, ainsi que les personnes souhaitant utiliser une nouvelle technique expérimentale, plus éthique et/ou mieux adaptée à son projet.

Le nombre d'animaux et les espèces utilisés sont adaptés à l'activité de l'établissement utilisateur (projet, nombre de personnels). C'est pourquoi, un maximum de 100 souris, 30 rats et 10 lapins sera utilisé pour la formation du personnel pendant la durée de ce projet (5 ans).

Toutes les procédures seront adaptées à l'espèce animale choisie réalisées par du personnel expérimenté. Toutes les dispositions seront prises pour améliorer le bien-être de l'animal dans la mesure où elles sont compatibles avec l'objectif de la procédure expérimentale. Par exemple, pour réduire le stress, les souris et les rats seront hébergés en groupe et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnel et/ou carré de cellulose ; celui des lapins sera enrichi par des bûchettes de bois à ronger (par exemple briquettes de peuplier).

2000- La maladie de Parkinson (MP) se caractérise par l'apparition de symptômes moteurs liés à la dégénérescence de la voie dopaminergique associée à la mort des neurones de la substance noire compacta (SNc). Les mécanismes de la MP restent inconnus mais on sait que différentes mutations du gène codant une protéine appelée l' α -synucléine (α -syn) conduisent à la MP. D'autre part, l'interaction entre l' α -syn et les produits d'autres gènes impliqués dans la MP comme LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) apparait essentielle. Certaines mutations de LRRK2 pourraient interagir fonctionnellement avec l' α -syn et amplifier son effet neurotoxique.

Notre projet vise à une meilleure compréhension du rôle de ces gènes impliqués dans les différentes formes de MP après injection selon une technique utilisée en neurochirurgie (approche stéréotaxique), de vecteurs viraux adéno-associés (AAV) permettant la surexpression des gènes d'intérêt, une étude comportementale, une caractérisation des modèles de la MP par imagerie TEP et analyse histologique des animaux. A terme le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques neuroprotectrices pourra être envisagé.

Le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet car aucun milieu de culture ou simulation numérique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité du métabolisme énergétique du cerveau. De plus, l'utilisation d'une souche de rongeur mimant la forme humaine de la MP permet d'espérer une application plus rapide en clinique des méthodes développées.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, proviennent d'un élevage autorisé et leur nombre de 650 a été réduit à un minimum nécessaire pour ne pas compromettre les résultats. Les examens IRM et TEP, examens non invasifs, seront effectués sous anesthésie générale et avec application locale d'analgésique afin d'éviter tout stress ou douleur liés au système de positionnement de l'animal qui diminuerait son bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller à leur bien-être.