



**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 (5)

401- La vaccination antigrippale saisonnière utilise des souches virales les plus à risque d'émerger et de causer une épidémie. Toutefois lors d'émergence de nouveaux variants imprédictibles (exemple H1N1 2009), la vaccination saisonnière est inefficace car les anticorps vaccinaux ne neutralisent pas le nouveau variant. Nous proposons de nouveaux vaccins antigrippaux, basés sur des protéines grippales très conservées entre variants et ciblées vers les cellules dendritiques, de sorte d'induire des réponses anticorps de haute affinité, et des réponses lymphocytaires T cytotoxiques puissantes. Le ciblage des cellules dendritiques sera réalisé à l'aide de vaccibodies (ligand d'un récepteur de chimiokine sur les cellules dendritiques en fusion avec 3 protéines grippales conservées) et de vaccicomplexes (anticorps ciblant des récepteurs endocytiques sur les cellules dendritiques en fusion avec 3 protéines grippales conservées). Ces nouveaux prototypes de vaccins protéiques (non répliatifs, biosécurité garantie) seront testés dans le modèle porc, espèce pertinente pour l'homme et cible vétérinaire de la vaccination. Le protocole inclut 2 expériences de contrôle de ciblage des cellules dendritiques de la peau par les vaccins (17 porcs) + 2 expériences d'immunisation (6 porcs de 2 mois par groupe) et une expérience de protection à l'épreuve virale (8 porcs par groupe). Cela porte le protocole à un total de 171 porcs.

402- La diffusion de molécules au niveau cérébral est difficilement évaluable, le cerveau faisant partie des compartiments dits « sanctuaires » du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique et de systèmes d'efflux tels que la glycoprotéine P (Pgp). Pour estimer la diffusion et prédire les concentrations dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le cerveau, des modèles pharmacocinétiques sont développés. L'objectif de l'étude est d'évaluer la diffusion intracérébrale d'antifongiques associés ou non à un inhibiteur de la Pgp, à partir de données obtenues lors d'expérimentations animales. *Scedosporium apiospermum* est un ascomycète responsable de méningites chez le patient immunocompétent (syndrome de quasi-noyade) ou immunodéprimé (transplantation pulmonaire au cours de la mucoviscidose, par exemple). Deux modèles de scedosporiose disséminée avec atteinte cérébrale ont été mis au point chez le rat immunocompétent et le rat immunodéprimé, reproduisant les deux contextes de survenue de ces atteintes cérébrales. Après détermination des doses efficaces, la pharmacocinétique de deux antifongiques (voriconazole, posaconazole) a été étudiée dans les deux modèles (rats immunocompétents et rats immunodéprimés) à partir des concentrations mesurées dans le sang, le LCR et le cerveau, chez le rat témoin ou infecté. A partir des données obtenues, un modèle PK/PD de diffusion intracérébrale des antifongiques a été établi. Nous proposons d'appliquer ces modèles à l'étude d'autres molécules antifongiques (autres azolés en phase préclinique comme le ravuconazole, l'isavuconazole ou l'albaconazole, antifongiques appartenant à d'autres classes chimiques comme les échinocandines ou les inhibiteurs de la synthèse de l'ancre glycosylphosphatidyl inositol, ...) qui seront utilisés seuls ou en association avec un inhibiteur de Pgp dans le but d'évaluer leur efficacité *in vivo* dans les scedosporioses méningées. Il s'agit donc d'un prérequis pour des études ultérieures chez l'homme. Le but est de permettre, à terme, l'adaptation de la posologie en fonction des résultats des dosages plasmatiques chez le patient, et ainsi un meilleur suivi thérapeutique de molécules ayant une diffusion cérébrale.

403- Le concept de vulnérabilité individuelle appliqué à la pathologie mentale implique l'intervention du patrimoine génétique et/ou du contexte environnemental comme la séparation maternelle, le déséquilibre du microbiote intestinal. Plusieurs facteurs semblent intervenir pour faire basculer l'individu de la vulnérabilité à la

pathologie. Un nombre croissant de travaux tend à montrer l'impact majeur du microbiote intestinal sur la physiologie de l'organisme permettant de le considérer comme un organe à part entière. Chez l'homme, la prématurité favorise un déséquilibre du microbiote intestinal, augmente le risque de développer des troubles cognitifs et des dépressions. Elle est aussi caractérisée par une séparation maternelle en raison des soins intensifs que les prématurés reçoivent. Notre objectif est d'étudier chez des rats l'impact de la colonisation bactérienne intestinale de prématurés humains et d'une séparation maternelle sur le risque de survenue de troubles comportementaux. Nous disposons d'un modèle d'étude unique des rats chez lesquels nous pouvons contrôler le déséquilibre des bactéries intestinales. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail et le nombre d'animaux (48) se justifie par les analyses comportementales et biochimiques qui seront effectuées.

Cette étude est une étape pour améliorer la prise en charge des prématurés.

404- Les maladies cardiovasculaires constituent la cause de décès chez 65% des personnes diabétiques. Plusieurs pathologies et conditions environnementales représentent un risque cardiovasculaire potentiel et induisent une dysfonction cardiovasculaire.

Le diabète est répandu au niveau épidémique dans le monde, c'est un syndrome de désordre métabolique, due à une combinaison entre des facteurs environnementaux et héréditaires, aboutissant à une glycémie anormale. L'une des principales répercussions du diabète est le dysfonctionnement endothélial.

Le Système Rénine-Angiotensine (SRA) est l'un des systèmes régulateurs les plus importants de l'organisme, il joue un rôle clé dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, donc l'étude de ce système nous permet de comprendre et de concevoir des nouvelles approches thérapeutiques pour contrôler de façon efficace les différents risques cardiovasculaires.

L'angiotensine II est la forme la plus active du SRA, son action dépend du récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1) ou de type 2 (AT2).

Le récepteur AT2 (AT2R) est présent essentiellement dans les reins, les poumons, le cœur, les artères et les artérioles. L'AT2R pourrait être impliqué dans la vasodilatation endothélium dépendante.

Des études épidémiologiques ont démontré que les femmes en pré ménopause sont plus protégées contre les maladies cardiovasculaires que l'homme. La fonction ovarienne est impliquée dans la production de NO dans la réponse inflammatoire et dans le stress oxydatif, de plus les œstrogènes protègent l'endothélium des femelles contrôles, mais cette protection est réduite chez les femelles diabétiques.

Le diabète conduit à une altération de la voie de dilatation endothélium dépendante, par contre l'œstrogène la favorise.

AT2R induit la vasodilatation endothélium dépendante dans des modèles contrôles, et il induit une vasoconstriction dans des conditions pathologiques.

Le diabète conduit à la néphropathie, et la suppression de AT2R accélère la survenue de celle-ci.

Par contre les œstrogènes pourraient avoir des effets réno-protecteurs ce qui est démontré dans plusieurs études récentes.

Notre objectif est d'étudier :

1-Le rôle des œstrogènes dans la survenue du diabète dans notre modèle.

2-Le rôle des œstrogènes et leur mécanisme d'action dans la protection des fonctions vasculaires et rénales dues au diabète.

3-Le rôle d'AT2R dans la survenue de diabète dans notre modèle.

4-Le rôle d'AT2R dans l'atteinte des fonctions vasculaires et rénales dans notre modèle de diabète.

405- De très nombreuses pathologies cérébrales sont mieux détectées en imagerie avec produit de contraste, tumeurs et maladies démyélinisantes peuvent ne pas être diagnostiquées sur simple IRM (sans produit). Les agents de contraste à base de gadolinium ont la propriété de se concentrer dans la tumeur en fonction des caractéristiques de celle-ci (nécrose, vascularisation...). Cependant, plus la détection est précoce plus cela est bénéfique pour démarrer un traitement. D'autre part, le nombre de tumeurs et/ou métastases sont également importante ainsi que les caractéristiques des tumeurs (infiltrantes, vascularisées...) sont des éléments permettant de déterminer la prise en charge du patient.

Le présent projet a pour objectif de déterminer à l'aide de modèles animaux de tumeurs et/ou de métastases cérébrales la capacité de produits de contraste à répondre au besoin médical abordé plus haut. Des produits déjà commercialisés serviront de référence et permettront de mieux évaluer la pertinence des produits de

contraste testés. Dans le cadre de ce projet d'une durée de 5 ans un total de 285 animaux (souris/rats) sera utilisé.

L'utilisation de différents modèles permettra de mieux cerner la physiopathologie humaine. L'expérience du centre expérimental ainsi que les compétences et expériences des intervenants dans ces différentes procédures et en expérimentations animales garantissent une prise en charge optimale du bien-être de l'animal.

406- Nous souhaitons étudier l'impact d'une nutrition de type « cafétéria », c'est-à-dire riche en lipides et en glucides, sur le développement de la glande mammaire et la lactation des souris, ainsi que sur le développement précoce (18 jours après la naissance) de la glande mammaire des descendants. Les phénotypes des animaux ayant reçu un aliment riche seront comparés à des animaux témoins ayant un aliment normal.

407- Dans le cadre de la thérapie génique, nous cherchons à optimiser la délivrance d'acides nucléiques codant des gènes d'intérêt thérapeutique à l'aide de vecteurs synthétiques. Dans ce but, notre équipe cherche à produire des vecteurs synthétiques optimisés pour délivrer des plasmides dans un organe cible. Afin de limiter le nombre de test in vivo, un premier screening 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 dans le sang ou différents tissus (musculaire, cutané, pulmonaire, hépatique). 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 450 le nombre de souris utilisées sur les 5 ans pour mener à bien les caractérisations.

408- Le but est de tester en condition réelle, l'efficacité de différentes formulations pour le traitement de l'otite externe chez le chien.

Suite à l'inoculation de micro-organismes infectieux, les traitements seront appliqués. L'efficacité microbiologique et clinique sera alors évaluée.

Les premières études, dites « pilotes », sont prévues avec au minimum 6 animaux par groupe test pour limiter l'impact de la variabilité.

Pour ces phases pilotes, environ 40 formulations seront testées afin d'en sélectionner une dizaine

Ensuite, lorsque seules les formulations d'intérêt auront été sélectionnées, d'autres études, dites « pivots », seront réalisées, avec 24 animaux par groupe, mais ce nombre sera ajusté au moment, en tenant compte des résultats des études pilotes et en respectant les règles des 3 R (réduction, raffinement, remplacement).

Le nombre total d'animaux prévu est donc de 480.

La procédure d'induction de l'otite consistera à inoculer dans l'oreille externe des microorganismes infectieux.

La seconde procédure consistera en l'administration du médicament dans les conditions normales d'utilisation.

Elle sera suivie par des examens cliniques et des examens microbiologiques (prélèvements par écouvillonnage).

Avant et possiblement après l'administration, des prises de sang seront réalisés afin de suivre la santé de l'animal.

L'hébergement s'effectuera dans les conditions normales d'hébergement de ces animaux selon les directives en vigueur.

409- Malgré l'existence de vaccins sûrs et efficaces, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) reste un problème de santé publique d'importance mondiale avec 400 millions de porteurs chroniques dans le monde. De plus, l'infection chronique par le VHB est un facteur de risque majeur dans le développement du cancer du foie. Notre programme de recherche a pour objectif d'aboutir à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie chronique du foie due à l'infection par le VHB, et de développer de nouvelles approches thérapeutiques pouvant participer à la guérison de cette maladie. L'étroite spécificité d'hôte du VHB et le déficit en modèles simples d'infection in vivo comme in vitro a été et demeure un handicap considérable au développement de la connaissance des mécanismes impliqués dans la pathogenèse du VHB. En particulier, l'absence d'un modèle d'infection du petit animal a considérablement freinée la mise en œuvre d'étude pour une meilleure compréhension des différents aspects liés à l'infection virale par le VHB.

Le concept novateur de la possibilité de repopulation du foie de souris par avantage sélectif des hépatocytes humains réimplantés sur les hépatocytes résidents, a incontestable ouvert une nouvelle voie pour l'étude des maladies hépatiques. En effet, le développement récent de modèles murins avec un foie «humanisé» est un outil de choix pour permettre de mieux comprendre les mécanismes d'infection et de réplication de ce virus afin de mieux appréhender le potentiel pathogénique et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Parmi ces modèles murins, il a été montré la prolifération d'hépatocytes humains dans le foie de souris transgéniques pour l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et immunodéficientes (SCID). Nous avons développé un système in vivo de maintien d'hépatocytes humains dans le foie de souris transgéniques uPA/SCID et nous utilisons un nouveau modèle de souris issu du croisement de deux souches pré établies (souris uPA/SCID x souris RAG/Gamma C): la souris uPA/RAG/SCID/Gamma C.

Le but des différents protocoles expérimentaux présentés est d'obtenir, dans un modèle murin au foie «humanisé» que nous développons, l'infection des hépatocytes humains par le VHB. Ces travaux nous permettront d'étendre nos connaissances sur le cycle infectieux complet du VHB, en particulier, l'étape d'entrée du virus dans l'hépatocyte et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- Pour le protocole de réversion de l'infertilité des souris uPA/RAG/SCID/Gamma C pour la reproduction : un total de 14 souris est nécessaire tout les 8 mois, soit un total de 105 souris.

- Pour le protocole d'infection par le virus humain de l'hépatite B de souris humanisé : pour chaque expérience d'une molécule antivirale à tester 30 souris sont nécessaire.

Dans ce contexte l'utilisation d'animaux est l'approche la plus approprié, les objectifs du projet ne permettant pas l'utilisation de méthode substitutive. Nous possédons la faisabilité technique permettant de réaliser les différentes procédures présentées. Ceci nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire. Au cours de l'expérimentation, le suivi des animaux permettra, si nécessaire, de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux.

410- L'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) est aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique. On estime à près de 400 millions le nombre de porteurs chroniques de ce virus dans le monde. L'infection chronique est associée à des lésions hépatiques d'intensité diverse, aboutissant à une hépatite chronique active. Cet état pathologique du foie peut induire une cirrhose qui dans environ 20% des cas conduit à un carcinome hépatocellulaire (CHC). Des données épidémiologiques ont d'ores et déjà permis de lier l'infection par le VHB à une probabilité accrue de développer un cancer hépatocellulaire. L'incidence de ces cancers est pour partie due à l'inflammation induite par l'infection virale mais elle découle également d'un effet direct de certaines protéines virales sur le foie du patient infecté. Parmi ces protéines, l'expression de la protéine HBx du virus de l'hépatite B peut interagir avec de nombreuses voies du métabolisme cellulaire et ainsi moduler la prolifération et la viabilité des hépatocytes. Nos travaux ont montré que les séquences de la protéine HBx isolées de tissus tumoraux se caractérisent par une délétion de la région C-terminale de la protéine et, in vitro, par des propriétés biologiques distinctes

Notre projet de recherche a pour objectif de développer des travaux, in vivo, sur la caractérisation des propriétés biologiques qui distinguent les mutants de la protéine HBx isolés de tissus hépatiques tumoraux et non tumoraux; ceci afin de mieux définir l'implication des mutants naturels de la protéine HBx dans l'évolution de la maladie hépatique. Une meilleure connaissance des mécanismes responsables de l'évolution de la maladie hépatique vers le CHC devrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutique.

Afin d'étudier, in vivo, l'impact de l'expression de ces protéines au cours des processus de prolifération et de la carcinogenèse hépatique, nous avons généré des souris transgéniques pour les séquences du gène X isolés à partir de tissus tumoraux et non tumoraux d'un même patient.

- Pour déterminer l'impact de l'expression de protéines HBx du VHB au cours du processus d'initiation de la carcinogenèse hépatique, au total 180 animaux seront nécessaire.

- Déterminer l'impact de l'expression de protéines HBx du VHB au cours du processus de prolifération hépatocytaire, au total 54 souris seront nécessaire.

Le projet de recherche a pour but d'élucidation de l'impact de l'expression d'une protéine du VHB dans un organe entier (le foie). Dans ce contexte l'utilisation d'animaux est l'approche la plus approprié, les objectifs du projet ne permettant pas l'utilisation de méthode substitutive. Nous possédons la faisabilité technique permettant de réaliser les différentes procédures présentées. Ceci nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire. Au cours de l'expérimentation, le suivi des animaux permettra, si nécessaire, de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux.

411- La sarcopénie liée au vieillissement est définie comme une réduction de la masse musculaire associée à une diminution de la force et à une altération de la performance physique. Divers déficits en nutriments d'intérêt et défauts d'adaptation à la prise alimentaire pourraient intervenir dans la perte de la masse et de la force musculaires et de la performance physique.

L'hypothèse de ce projet est que la consommation d'une alimentation riche en nutriments essentiels, acides gras polyinsaturés, protéines à forte valeur nutritionnelle et molécules anabolisantes d'origine végétale, pourrait améliorer la masse et le métabolisme musculaire chez le rat âgé sarcopénique.

L'objectif spécifique de cette étude in vivo est de mesurer l'impact d'une formulation constituée des éléments cités précédemment (micronutriments essentiels, acides gras polyinsaturés, protéines à forte valeur nutritionnelle et extraits végétaux) sur la synthèse protéique musculaire post-prandiale chez le rat âgé sarcopénique. Dans ce projet nous testerons deux extraits végétaux nommés A et B, pour des raisons de confidentialité. Ces extraits seront intégrés à l'alimentation des animaux, dans les mêmes proportions que celles qui seront présentes dans la formulation qui sera testée chez l'Homme. Il a été montré, au cours d'études précédentes que ces extraits végétaux n'ont pas d'effet délétère chez l'animal. Il en est de même pour tous les autres constituants de la formulation. Ces derniers ne sont pas nommés pour des raisons de confidentialité et tous ont été testés individuellement chez l'animal dans des protocoles séparés et sont sans effet délétère chez l'animal. Pour répondre à l'objectif de notre étude, nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des rats mâles Wistar âgés. Les rats Wistar sont un bon modèle pour l'étude du vieillissement musculaire ; ils deviennent sarcopéniques avec l'âge, avec comme chez l'Homme, une perte importante des muscles de type 2 et une accumulation de tissu adipeux viscéral et intra-musculaire. Les rats seront séparés en 8 lots, chaque lot sera soumis à un régime différent pendant 4 mois afin de mesurer l'impact des extraits végétaux A et B intégrés à la formulation complète en comparaison avec des rats nourris avec un régime standard (apport protéique classique sous la forme de 14% de caséine) ou avec un régime « contrôle » (apport protéique issu de la formulation). A terme, 18 animaux par groupe seront abattus : 9 animaux à jeun et 9 animaux en période post prandiale. Nous comparerons les mesures effectuées durant les phases pré- et post-prandiales, la sarcopénie étant une conséquence d'un défaut de réponse à l'action anabolique des nutriments et hormones associés à la prise alimentaire.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettront de mesurer l'impact de la formulation complète avec chacun des composés A et B sur le métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé sarcopénique.

412- La fibrose rénale correspond à la destruction irréversible des structures fonctionnelles du rein. Dans le cadre de la transplantation rénale, les causes de perte de fonction du greffon rénal sont multiples, incluant les atteintes immunologiques, les pathologies vasculaires et l'exposition à des toxiques dont la cyclosporine A (CsA). Dans un premier temps, nous avons caractérisé le transcriptome tubulaire rénal de la CsA in vivo chez le rat. L'analyse de tubules microdisséqués par microarray nous a permis d'identifier un gène, NUPR1, dont l'expression est augmentée fortement (86 fois) sous cyclosporine dans le tubule rénal. Ce gène n'a pas été étudié dans les pathologies tubulaires rénales, mais dans d'autres organes il joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, l'apoptose et l'inflammation. Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de ce gène in vivo au cours des pathologies fibrosantes rénales. Dans un travail préliminaire, nous avons trouvé que les animaux invalidés pour NUPR1 (NUPR1^{-/-}) présentent sous CsA des lésions rénales plus sévères que les animaux dont le gène NUPR1 est intact. L'ARN de NUPR1 est augmenté dans d'autres modèles (obstructif, ischémique, hypertensif).

NUPR1 pourrait être un gène important pour l'adaptation endogène du rein aux agressions rénales en général. L'utilisation d'un modèle de lésions rénales in vivo est indispensable pour intégrer simultanément les composantes vasculaires, tubulaires et interstitielles de la pathologie rénale. Nous souhaitons évaluer l'effet de NUPR1 au cours de diverses agressions rénales (en utilisant des souris sauvages et des souris dont le gène *nupr1* a été invalidé), et en étudier le mécanisme. Le nombre de souris nécessaire est estimé à 224 souris. En effet, en raison des variations inter-individuelles et inter-expériences de la pathologie rénale, et de la nécessité d'utiliser des tests non paramétriques (la quantification des lésions rénales ne suit pas une distribution normale), il est nécessaire de prévoir par expérience 8 animaux dans chaque groupe, et d'effectuer 3 fois les expériences.

413- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité au-delà de 50 ans dans les pays développés et touche plus de 30 millions de personnes dans le monde.

Il en existe deux formes : la forme sèche et la forme humide

La DMLA sèche, ou atrophique, est la forme la plus fréquente (90 % de l'ensemble des cas)

La DMLA humide également appelée « dégénérescence maculaire exsudative ou néo-vasculaire » est la forme la plus grave et la plus sévère; elle ne se manifeste qu'à un stade avancé de la maladie. Elle est caractérisée par la prolifération de vaisseaux sanguins anormaux (angiogenèse) d'où il peut s'échapper du sang ou du plasma. Elle peut rapidement endommager la macula et provoquer une perte brutale de la vision centrale.

Ce symptôme peut être reproduit chez les rongeurs (rats) suite à une microlésion sous la rétine induite grâce à un laser ophthalmique.

Ce modèle est un modèle de référence pour l'évaluation pharmacologique de produits à visée anti-angiogéniques.

Afin d'évaluer l'activité anti-angiogénique de nos composés nous avons choisi d'utiliser le modèle de néovascularisation choroïdienne induite chez le rat suivi d'une injection intra-vitréenne des composés testés.

Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

L'analyse statistique étant réalisée sur les lésions mesurées de façon indépendante (indépendantes entre elles au sein d'un même œil et indépendante entre individus) cela nous permet de diminuer fortement le nombre d'animaux nécessaire à l'évaluation de nos composés.

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 240 rats par an (1200 rats sur 5 ans)

414- L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la bronchiolite et de la pneumonie du jeune enfant, ainsi que dans la pneumonie et les complications respiratoires infectieuses du sujet âgé. Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable in vitro sur des cellules humaines, ceci dans le but de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Cependant, étant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans les pathologies pulmonaires inflammatoires, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit les différents aspects de ces maladies du système respiratoire, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris infectées par le virus respiratoire syncytial humain (RSV), afin de se rapprocher au plus près des conditions d'infection avec ce même virus chez l'homme. La plupart des animaux utilisés dans ce projet seront exposés à une ou deux administrations intra-nasales du virus RSV, le choix du nombre d'expositions au virus étant dicté par le degré d'inflammation recherché dans les poumons et le mécanisme d'action des composés à tester. Les signes cliniques attendus sont modérés (perte de poids consécutive à l'inflammation pulmonaire après l'infection au RSV). Une observation quotidienne des animaux est réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et un avis vétérinaire est demandé en cas de doute. En cas de signes cliniques de souffrance au-delà de ceux attendus, des points limites sont mis en œuvre.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur a déjà été réalisée, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de l'inflammation pulmonaire ou de la charge virale dans les poumons.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 1600 souris par an, soit 8000 animaux au total pour la durée totale du projet sur 5 ans.

415- Le but du projet est de tester l'efficacité de l'utilisation de polymères biocompatibles en chirurgie digestive afin de protéger/renforcer les sites opératoires en cas d'anastomose (mise en communication de 2 organes creux), d'agrafages (suture mécanique) et/ou de plaie accidentelle/volontaire pratiquée au niveau du tube digestif. Le taux de complications chirurgicales telles que les lâchages/fistules au niveau des anastomoses et des sites d'agrafage est variable selon le segment intestinal considéré pouvant atteindre 30% en cas d'anastomose colorectale. Les complications du site chirurgical sont gravées d'importantes conséquences qui peuvent mettre en péril la vie du patient, qui sera amené à subir des multiples interventions, chirurgicales ou non, augmentant énormément les coûts d'une hospitalisation. Peu de produits biocompatibles et biodégradables présents sur le marché ont montré une efficacité dans la réduction des complications chirurgicales. La difficulté majeure dans le développement des biomatériaux à usage chirurgical est le contrôle de la biodégradabilité. Idéalement, une cinétique optimale de dégradation doit être ni trop rapide (pour pouvoir offrir un support mécanique efficace aux tissus en voie de guérison, surtout les premiers jours), ni trop lente pour ne pas créer un effet de corps

étranger limitant le processus naturel de remodelage tissulaire. Une gamme de biomatériaux complètement résorbables et offrant la possibilité de moduler leurs propriétés mécaniques et la cinétique de dégradation a été récemment mise au point et testée in vitro. Ces produits doivent maintenant être validés in vivo chez l'animal avant d'envisager une utilisation chez l'Homme.

Remplacement: Une première sélection des biopolymères a été réalisée in vitro. Toutefois pour tester l'hypothèse que la protection du site chirurgical par couverture avec le polymère biodégradable à l'étude soit efficace pour réduire le risque de complications, un modèle avec survie est nécessaire. L'espèce la plus adaptée pour une traduction fiable des données chez l'homme est le cochon pour différentes raisons:

- 1) l'anatomie est similaire
- 2) les sécrétions digestives (jus pancréatique, bile, jus gastrique) ont une composition tout à fait superposable
- 3) la taille du cochon permet l'exécution de procédures chirurgicales par abord mini-invasif de manière tout à fait comparable à l'homme.

Réduction : l'étude sera déclinée en 7 phases. Pour les phases 1 à 4, l'efficacité du produit sera évaluée dans 4 applications différentes par chirurgie ouverte. Trois groupes de 6 cochons seront étudiés dans chaque phase, pour un total de 72 cochons. Pour les phases 5 à 7, l'efficacité des biomatériaux sera évaluée dans des modèles de chirurgie laparoscopiques et endoscopiques, sur 54 cochons. Le passage aux phases 5-7 dépendra des résultats des phases 1-4. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori. L'utilisation de 6 cochons sera suffisante pour conclure sur le comportement du biopolymère

Raffinement: Les douleurs post-opératoires seront modérées dans les situations de chirurgie ouverte et légères en cas de chirurgie laparoscopique. Les animaux recevront un protocole de soin adapté, et des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

416- L'obésité est un problème de santé publique qui s'accompagne de troubles métaboliques majeurs et représente un facteur de risque pour des pathologies cardiovasculaires, respiratoires, musculo-squelettiques, ayant un impact dramatique sur la durée et sur la qualité de la vie. La chirurgie est aujourd'hui le seul traitement pour obtenir un contrôle durable du poids et des complications de l'obésité. Un rôle important dans la genèse de l'obésité est joué par des hormones produites par des cellules présentes au niveau du système digestif ayant pour fonction le contrôle de la sensation de « faim ». La possibilité d'effectuer un traitement « préparateur » à la chirurgie de l'obésité faisant perdre une partie de l'excès de poids au patient avant l'intervention chirurgicale pourrait avoir des répercussions majeures sur la prise en charge. Une cible possible a été identifiée dans la modulation des hormones régulant l'appétit. Des études chez l'animal ont montré que l'embolisation sélective de l'artère gastrique gauche (AGG) permet de réduire, la production d'une telle hormone, la ghréline. Toutefois, une telle approche n'est pas compatible avec un traitement chirurgical ultérieur car le patient serait à risque accru de développer une fistule au niveau de la jonction gastro-œsophagienne. Si l'embolisation de l'artère gastro-épiplœique droite (AGED) devait produire le même effet de réduction de la ghréline, dans ce cas les avantages seraient multiples : 1) modulation hormonale avec réduction de la production de ghréline et perte de poids initial (préopératoire) et 2) conditionnement ischémique de la zone (jonction gastro-œsophagienne) la plus à risque de fistule.

Le but du projet est 1) de vérifier si l'embolisation de la AGED réduit la production de ghréline et 2) vérifier la présence d'un effet de conditionnement ischémique de la jonction gastroœsophagienne.

Il s'agit d'un projet en plusieurs phases, le passage ou non à une phase successive dépendra des résultats en amont.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement: Pour tester l'hypothèse que l'embolisation de l'AGED (nourricière de la grande courbure de l'estomac) soit aussi efficace que l'embolisation de l'AGG dans la réduction de la production de ghréline, le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car il est omnivore; la vascularisation de l'estomac est similaire à celle de l'Homme.

Réduction: ce projet sera décliné en 3 phases. Pour les phases 1 et 2, 18 cochons seront inclus et divisés en 3 groupes. Pour la troisième phase, 18 cochons supplémentaires seront inclus pour un total de 36 cochons. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori. L'utilisation de 6 cochons par groupe (avec un groupe contrôle) devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants.

Raffinement: le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs postopératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins postopératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des anti-douleurs 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.

417- Actuellement, les dispositifs médicaux sont des produits de santé qui se développent fortement, avec des applications extrêmement variées. Les dispositifs médicaux sont répartis en quatre classes selon le risque croissant. La classe III recense les produits avec un risque potentiel très sérieux pour l'homme. Il est donc d'autant plus important de tester préalablement et avec précaution ces dispositifs avant de les utiliser en médecine humaine.

Pour cela une norme a été définie afin de contrôler au mieux l'évaluation biologique des dispositifs médicaux: ISO 10993.

Le présent projet consiste à évaluer la performance et la tolérance locale de dispositifs médicaux de type III, formulés à base de biomatériaux injectables et résorbables.

Ces dispositifs peuvent être utilisés pour diverses applications: ophtalmologie, traitement de l'arthrose, cicatrisation, chirurgie réparatrice, etc. ...

L'évaluation se fera après implantation intradermique au niveau de la zone dorsale chez le Lapin Néo Zélandais. Il est envisagé l'utilisation de 500 lapins en 5 ans, pour l'évaluation d'au moins 5 dispositifs différents.

La durée d'implantation dépendra de la composition exacte des dispositifs médicaux et du champ d'application envisagé.

Des observations régulières seront réalisées afin de contrôler l'évolution des implantations dans le temps et l'état de santé générale des animaux.

Toutes les précautions seront prises afin de limiter l'impact sur les animaux et afin de limiter le stress généré.

Des enrichissements seront mis à disposition des animaux comme:

- une tablette de repos/cachette,
- un bloc de bois de peuplier à ronger,
- et du foin.

De plus, un programme de socialisation spécifique aux Lapins sera fait afin d'habituer les animaux au contact de l'homme.

Le bénéfice attendu est de pouvoir mettre sur le marché des dispositifs médicaux sûrs pour le patient, et dont les éventuels effets secondaires sont connus.

Ces études permettront en outre de vérifier que les produits ne sont pas dégradés trop rapidement par l'organisme, afin d'obtenir un effet à moyen terme.

418- La toxoplasmose a un double impact en santé humaine et en santé animale. Chez l'homme, elle est la deuxième cause de malformations congénitales, après la trisomie 21. Dans le domaine animal, elle est responsable de pertes économiques en élevage ovin et caprin, par les avortements qu'elle provoque. La consommation de mouton infecté représente la cause principale de la toxoplasmose humaine, première zoonose alimentaire en France.

L'observation qu'une primo-infection protège contre une réinfection permet d'envisager raisonnablement une stratégie vaccinale contre le parasite. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin humain contre la toxoplasmose et seul un vaccin vivant est commercialisé contre les avortements chez la brebis.

De nombreux essais de vaccination montrent des protections significatives qui sont insuffisantes, d'où la nécessité de développer des stratégies d'optimisation.

Dans ce projet, l'optimisation repose sur la combinaison d'adjuvants. Cette stratégie d'optimisation est évaluée dans un modèle murin contre la toxoplasmose chronique. La souris est un hôte naturel du parasite. Dans une étape ultérieure, la protection sera évaluée contre une toxoplasmose congénitale, c'est pourquoi des souris femelles sont utilisées.

En vaccination, de nombreux facteurs inhérents aux manipulations et au modèle animal sont sources de variabilité. Par exemple, l'infection par voie naturelle, soit la voie orale conduit à l'installation de kystes dont le nombre est variable. Pour apprécier une diminution significative il faut un nombre suffisant d'animaux par lot. Sur la base de nos expériences antérieures, le nombre minimum d'animaux est de 8. Chaque lot comprendra 12 souris, 8 pour la protection et 4 pour l'analyse de la réponse cellulaire.

Pour les deux premières expériences, le nombre calculé d'animaux est de 120. Si une protection est observée dans les deux expériences, la troisième expérience comprendra 60 animaux, si une protection est observée dans l'une ou l'autre expérience, la troisième expérience comprendra 36 animaux. Le nombre total d'animaux sera donc de 120, 156 ou 180.

Les animaux sont hébergés dans une animalerie habilitée qui répond aux normes exigées.

419- La série d'expériences est réalisée dans le but d'évaluer (a) l'influence des soins paternels sur l'ontogénèse des différents traits de tempérament et (b) l'influence des différents traits de tempérament sur la réponse au stress chez la souris glaneuse (*Mus spicilegus*). Nos résultats préliminaires ont démontré que cette espèce est particulièrement appropriée pour l'étude des personnalités animales.

La première partie de l'étude est basée sur une comparaison entre des jeunes élevés avec et sans présence du père. Dans les deux groupes, les soins maternels seront évalués, les soins paternels n'étant évalués que lorsque le père est présent. L'éventuel effet de la présence et de la qualité des soins paternels sur le tempérament des jeunes sera évalué à différentes étapes de leur vie (juvénile, sub-adulte, adulte) à l'aide d'une batterie de tests standardisés et validés sur cette espèce.

Dans une seconde partie, ces jeunes seront soumis à différents types de stress chronique durant 6 jours (confronté à une odeur de prédateur ; confronté à la présence d'une paire étrangère composée d'un mâle et d'une femelle plus âgée et un groupe contrôle) et nous mesurerons leurs réponses au stress en relation avec leurs traits de tempérament.

Les animaux seront euthanasiés en fin d'expérience afin de récupérer des échantillons sanguins.

Une troisième partie sera d'ordre méthodologique. Le but étant de valider le test non invasif utilisé pour mesurer les hormones de stress (nécessaire pour la seconde partie). Nous validerons ici si le test mesure les bonnes hormones métabolisées. Au total, nous utiliserons 195 individus pour l'ensemble des expériences envisagées. Ce nombre est nécessaire afin d'obtenir un échantillon suffisamment important d'animaux (provenant de différentes portées) dans les différents sous-groupes. Ceci dans le but de tester statistiquement notre question d'intérêt, compte tenu du caractère multidimensionnel de notre projet.

420- *Coxiella burnetii*, l'agent de la fièvre Q, est responsable d'une zoonose qui induit des avortements chez l'animal et chez la femme. La fièvre Q peut également se chroniciser et le diagnostic de la fièvre Q chronique est souvent péjoratif. Des travaux récents ont montré que *Brucella abortus*, l'agent de la brucellose, persiste spécifiquement au niveau des ganglions cervicaux après infection de souris au niveau de la cavité buccale.

Comme *C. burnetii* et *B. abortus* partagent un certain nombre de caractéristiques communes, nous pensons que *C. burnetii* pourrait persister également dans les ganglions cervicaux après infection buccale.

L'objectif de notre projet est donc d'étudier les réponses des souris à *C. burnetii* après infection au niveau de la cavité buccale, ce qui nous amène à aborder le problème plus général du rôle des ganglions lymphatiques cervicaux dans les défenses anti-infectieuses.

L'étude du rôle des ganglions cervicaux dans la réponse anti-infectieuse ne peut être envisagée en dehors d'un organisme entier. Pour cela, des souris seront utilisées et infectées par voie buccale et par voie intrapéritonéale (à titre de groupe témoin) afin d'étudier la spécificité des propriétés de l'infection buccale. Pour des raisons d'homogénéité, les infections par les deux voies seront réalisées en utilisant la même espèce bactérienne et le même inoculum.

Ce projet comportera deux groupes de souris (souris inoculées au niveau de la cavité buccale et souris inoculées via la voie intrapéritonéale) et 9 cinétique pour chaque groupe seront réalisées avec 11 souris par cinétique, soit 99 souris seront utilisées pour chaque groupe, donc au total 198 souris seront utilisées au cours de ce projet.

421- La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (1/3500 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, résulte en une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de cette pathologie. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral, d'un gène thérapeutique qui peut être de deux natures :

(i) soit une petite séquence d'ADN capable de « réparer » la dystrophine endogène par saut d'exon, une stratégie thérapeutique qui permet de supprimer la partie du gène portant la mutation afin de permettre à la cellule de fabriquer une dystrophine plus courte mais fonctionnelle (« quasi-dystrophine »).

(ii) soit une copie du gène de la dystrophine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine dystrophine correcte. Afin de pouvoir être transférée in vivo à l'aide d'un vecteur viral, qui ne peut contenir que des gènes relativement courts, cette copie du gène de la dystrophine a été raccourcie, tout en restant fonctionnelle (forme « micro-dystrophine »).

Nous avons déjà démontré l'efficacité thérapeutique de ces deux approches, dans le modèle du chien atteint de DMD (chien GRMD, Golden Retriever Muscular Dystrophy), après une injection locorégionale dans un ou deux membre(s) isolé(s), d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr) porteur soit d'une séquence U7snRNA, capable de réaliser un saut d'exon sur le gène de la dystrophine, soit d'une séquence micro-dystrophine. Cette approche par injection locorégionale était indispensable à une époque où personne n'avait réussi à montrer une efficacité thérapeutique au delà d'un seul muscle isolé. Cette preuve d'efficacité dans un groupe musculaire (membre entier), ainsi que l'augmentation significative des capacités de production des vecteurs AAVr, ouvre maintenant la voie vers une injection dans le corps entier, seule approche qui pourra permettre de toucher l'intégralité des muscles de l'organisme, et espérer ainsi un traitement réel de cette maladie aujourd'hui incurable.

Notre projet vise donc à évaluer l'efficacité thérapeutique de nos deux vecteurs médicaments (AAVr-U7snRNA et AAVr-micro-dystrophine) après injection systémique (voie intraveineuse) chez le chien GRMD. Un total de 18 chiens GRMD seront inclus, répartis en 6 groupes de 3 animaux, dont un groupe témoin, afin d'évaluer plusieurs doses de chacun de ces vecteurs, mais également 2 versions génétiques différentes du gène micro-dystrophine. Les animaux seront injectés à l'âge de 2 mois et gardés 6 à 7 mois post-injection.

Des analyses exhaustives seront réalisées sur chaque animal afin d'évaluer l'efficacité du traitement à la fois aux niveaux moléculaire et histologique mais aussi phénotypique (évaluation de la locomotion et des fonctions cardiaque et respiratoire) et immunologique.

422- Dans le but d'améliorer la stabilité d'un produit immunologique, destiné à des pays qui ne maîtrisent pas en totalité la chaîne de froid (conservation normale à 4°C) et dont l'objet est de protéger une espèce de carnivore domestique contre une pathologie majeure du terrain, ce projet consiste à tester des formulations innovantes de ce produit.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne, et requiert la mise en œuvre d'une procédure expérimentale liée à l'évaluation de la tolérance et de l'efficacité du produit. Cette procédure sera conduite sur l'espèce de destination.

Ce projet est également conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- Ces procédures ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales car elles répondent à l'obligation réglementaire de les conduire sur l'espèce de destination et à l'âge minimum préconisé pour le traitement,

- le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum car 2 procédures seront conduites en une seule (tolérance et efficacité). Ainsi, le nombre d'animaux envisagé ne sera pas supérieur à celui déterminé par la réglementation, et sera de 144 animaux au maximum.

423- Dans la rétine des mammifères, il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets dont le rôle consiste à transformer les stimuli lumineux en signaux électriques (phototransduction). Les deux types de photorécepteurs sont différents au niveau de leur segment externe:

La partie apicale des segments externes est entourée par les invaginations de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Dans le bâtonnet, les structures membranaires sont des disques ou saccules empilés. Pour les cônes, la structure lamellaire consiste en un repli de la membrane plasmique ou microvillosités tout le long du segment externe. Celui-ci n'établit pas de contact étroit avec l'EPR. Contrairement aux cônes, le renouvellement des segments externes chargé de pigments photosensibles est bien connu dans le cas des bâtonnets. En effet, les segments externes des bâtonnets sont constamment renouvelés par la formation de nouveaux disques à l'extrémité du segment et par l'élimination des vieux disques par les cellules de l'EPR à l'extrémité externe. Le renouvellement des segments externes des cônes quant à lui est un processus encore méconnu, plus diffus et qui semble se produire à plusieurs endroits dans le segment externe.

Des études antérieures ont permis d'analyser ultrastructurellement des yeux de macaques (obtenus par prélèvement post-mortem) par microscopie électronique. Une structure, encore non décrite dans la littérature a été mise en évidence, en forme de vésicule aux bords des segments externes des cônes.

L'hypothèse émise suite à ces études est que ces vésicules pourraient jouer un rôle fondamental dans le renouvellement des segments externes des cônes. Le but de la présente étude est d'identifier le mécanisme de renouvellement des segments externes des cônes

424- Cette étude s'inscrit dans un projet FUI ayant pour objet le développement d'implants hybrides biomimétiques, bioactifs et résorbables à matrice polymère et charges céramiques pour la réparation osseuse. A travers une conception basée sur le biomimétisme, on obtient des gradients de propriétés mécaniques et de résorption améliorant l'ostéointégration et la fonctionnalité de l'implant. L'intérêt de l'utilisation de tels matériaux en ostéosynthèse est de réduire les risques de complications et d'infections, stimuler la régénération osseuse et éviter une seconde intervention pour enlever le dispositif (actuellement métallique). Le but de l'étude in vivo décrite ici est 1) de vérifier la tenue mécanique (l'absence de déformation) de plaques hybrides en apposition sur l'os et 2) de mettre en évidence la dégradabilité des matériaux sur 3 mois. L'étude sera réalisée sur 32 rats WISTAR RjHan.

425- Dans la majorité des troupeaux ovins, on trouve des agneaux orphelins ou délaissés par leur mère ainsi que de nombreuses brebis prolifiques dont la lactation ne suffit pas pour nourrir la trop nombreuse portée. La solution la plus économique consisterait à faire adopter ces agneaux par d'autres brebis mais elle est difficile à mettre en place car les brebis refusent d'allaiter un agneau qui n'est pas le leur, à moins qu'il s'agisse d'un nouveau-né dont l'adoption s'effectue immédiatement à la mise bas. Ainsi, dans les élevages ovins, l'allaitement artificiel est la solution de rigueur, les éleveurs remplaçant le lait de la mère par un aliment commercial distribué aux agneaux au moyen d'un nourrisseur. De toute évidence, le principal avantage de l'allaitement artificiel est la possibilité de sauver des agneaux qui autrement sont voués à la mort.

Malgré cela, l'allaitement artificiel n'offre pas des gages de satisfaction : atelier demandant beaucoup d'attention mais parfois négligé car trop chronophage, agneaux chétifs, croissance décevante, diarrhée fréquente, mortalité plus élevée que chez les agneaux laissés avec leur mère. Récemment le président de l'Association Régionale des Eleveurs d'Ovins du Centre a alerté l'INRA des difficultés rencontrées par la filière soulevant un problème de mortalité importante (40-80 %) et parfois tardive (à 3 semaines d'âge) depuis 10-15 ans sans que les raisons en soient connues.

L'objectif du présent projet est :

- 1) Caractériser le comportement des agneaux mis en allaitement artificiel. Il s'agira de mettre en relation des critères de vigueur néonatale avec le succès de l'adaptation à l'allaitement artificiel, l'occurrence de problèmes de santé, et les chances de survie.
- 2) Améliorer les facteurs nutritionnels avant sevrage. La colonisation microbienne du tractus digestif chez le jeune agneau représente une étape clé du développement de la fonctionnalité du rumen. La mortalité d'agneaux à l'âge d'un mois de pathologies vraisemblablement digestives laisse suspecter un problème de déséquilibre au niveau de la flore bactérienne, causant à la fois des problèmes de santé et de comportement. L'objectif sera de favoriser le fonctionnement du rumen via un complément alimentaire.
- 3) D'avoir une approche comportementale via un test de réactivité émotionnelle afin d'établir des corrélations avec la capacité d'adaptation à l'allaitement artificiel.
- 4) De soumettre des agneaux élevés à un challenge vaccinal pour mesurer l'impact d'un élevage en allaitement artificiel sur la réponse immunitaire.

426- Malgré les traitements néphroprotecteurs, l'évolution des maladies rénales chroniques vers l'insuffisance rénale terminale reste inéluctable. Elle s'associe au développement d'une fibrose interstitielle qui se caractérise par une atrophie corticale, une raréfaction capillaire et l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire. Les traitements actuels permettent de ralentir l'extension de la fibrose mais ni de l'interrompre ni de la faire régresser. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, il est indispensable de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la fibrose rénale.

La Thrombospondine 1 (TSP-1) est une protéine qui possède des propriétés fibrosantes, antiangiogéniques et immunomodulatrices. Alors qu'elle est très peu exprimée dans le tissu rénal sain, son expression augmente significativement après une agression rénale. Son rôle dans le développement de la fibrose rénale a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux de néphropathie : glomérulonéphrite, diabète, ischémie-reperfusion, réduction néphronique. Parmi les nombreux partenaires interagissant avec la TSP-1, le récepteur CD47 est particulièrement intéressant. En effet, plusieurs arguments suggèrent qu'il est indispensable pour l'effet anti-angiogénique de la TSP-1. Il joue également un rôle complexe dans l'inflammation qui n'est pas encore complètement élucidé. Plusieurs études ont démontré le rôle du CD47 dans le développement des lésions secondaires à une privation d'oxygène dans différents organes (foie, muscle, peau, cerveau) chez le rat et la souris. A notre connaissance, une seule étude a montré un effet délétère du CD47 sur le rein dans un modèle murin. Dans l'unité, nous avons montré que le déficit en TSP-1 protège partiellement les souris des

lésions rénales induites par la ligature d'un des uretères (fibrose, inflammation, destruction des tubules rénaux). Nous proposons dans ce nouveau projet d'étudier le rôle du CD47 dans le développement des lésions rénales induites par ligature urétérale et de le comparer à celui de la TSP-1.

Pour cela, dix souris déficientes pour le gène TSP-1 (TSP-1 KO), dix souris déficientes pour le gène CD47 (CD47-KO) et dix souris témoins exprimant TSP-1 et CD47 (WT) seront soumises à une ligature urétérale unilatérale sous anesthésie générale. Nous étudierons dix jours plus tard dans les trois groupes le développement de la fibrose, de l'inflammation et les lésions des tubules du rein. Nous compléterons l'analyse de l'inflammation intravasculaire par microscopie intravitale qui permet de visualiser filmer à l'intérieur des petits vaisseaux les globules blancs marqués par un fluorochrome (10 animaux supplémentaires par groupe). Le nombre total d'animaux sera donc de 60.

Le modèle de ligature urétérale unilatérale a été choisi pour plusieurs raisons. Premièrement, ce modèle permet de diviser par deux le nombre d'animaux nécessaires, chaque souris étant son témoin. En effet, le rein non ligaturé sert de témoin au rein controlatéral obstrué par ligature urétérale unilatérale. Deuxièmement, il s'agit d'un modèle générant des lésions de fibrose rénale en quelques jours ce qui permet de limiter la durée du protocole. Troisièmement, la thrombospondine 1 et le CD47 ont des propriétés immunomodulatrices qui sont potentiellement impliquées dans la genèse de la fibrose rénale. Nous avons donc choisi un modèle de fibrose caractérisé par une inflammation importante. Enfin, nous avons choisi le modèle de ligature urétérale unilatérale car il s'agit d'un modèle simple, reproductible et maîtrisé par les investigateurs.

427- Dans le cadre de nos études portant sur l'évaluation de l'efficacité et la toxicité de drogues anticancéreuses, notre équipe développe des modèles murins de xénogreffes de tumeurs humaines. Ces modèles animaux permettent i) de tester in vivo de nouvelles thérapies du cancer et d'améliorer les traitements utilisés en clinique humaine, ii) de préserver des lignées de cellules tumorales (sous forme de tumeur solide) pour les types de cancer difficiles à greffer chez l'animal.

Après la xénogreffe, le développement tumoral et/ou la régression tumorale suite à un traitement thérapeutique sont appréciés par calcul hebdomadaire du volume de la tumeur primaire ou plus rarement par détection de la bioluminescence émise par les cellules cancéreuses préalablement transfectées avec le gène de la luciférase. Néanmoins la visualisation des tumeurs primaires et secondaires sur ces modèles tumorigènes nécessite l'injection chez l'animal d'un agent intermédiaire (la luciférine, substrat de la luciférase) conduisant aux émissions bioluminescentes. La détection de la tumeur est peu fiable car dépendante de l'injection du substrat, de sa répartition dans le tissu et de sa capacité à atteindre la tumeur.

Par souci d'améliorer le bien être animal et la fiabilité des résultats, nous souhaiterions développer de nouveaux modèles qui permettraient une détection tumorale moins contraignante pour l'animal et le manipulateur. Pour cela nous envisageons le développement de modèles murins de xénogreffe pour lesquels le suivi tumoral serait réalisable par imagerie de fluorescence (lignée cellulaire transfectées avec le gène de la GFP pour Green Fluorescent Protein ou DsRed pour *Discosoma sp.* Red fluorescent protein). En outre la possibilité de suivre l'évolution de la tumeur primaire, il sera éventuellement possible de détecter la formation de métastases. Cette approche limitera le nombre d'injections réalisées chez l'animal puisqu'il n'y aura pas lieu d'administrer un substrat luminescent.

Afin de limiter le nombre de souris utilisées dans cette expérience nous réaliserons une première étude de faisabilité sur un nombre limité de souris (3 animaux par groupe) suivie en cas de succès d'une étude portant sur 10 animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et donc concluants.

428- La toxoplasmose a un double impact en santé humaine et en santé animale. Chez l'homme, elle est la deuxième cause de malformations congénitales, après la trisomie 21. Dans le domaine animal, elle est responsable de pertes économiques en élevage ovin et caprin, par les avortements qu'elle provoque. La consommation de mouton infecté représente la cause principale de la toxoplasmose humaine, première zoonose alimentaire en France.

L'observation qu'une primo-infection protège contre une réinfection permet d'envisager raisonnablement une stratégie vaccinale contre le parasite. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin humain contre la toxoplasmose et seul un vaccin vivant est commercialisé contre les avortements chez la brebis.

De nombreux essais de vaccination montrent des protections significatives mais encore insuffisantes, d'où la nécessité de développer des stratégies d'optimisation.

Dans ce projet, ces optimisations reposent sur le ciblage de cellules impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire, la combinaison d'adjuvants et de voies d'immunisation. Ces stratégies d'optimisation sont

évaluées dans un modèle murin contre la toxoplasmose chronique. La souris est un hôte naturel du parasite. Dans une étape ultérieure, la protection sera évaluée contre une toxoplasmose congénitale, c'est pourquoi des souris femelles sont utilisées.

En vaccination, de nombreux facteurs inhérents aux manipulations et au modèle animal sont sources de variabilité. Par exemple, l'infection par voie naturelle, soit la voie orale conduit à l'installation de kystes dont le nombre est variable. Pour apprécier une diminution significative il faut un nombre suffisant d'animaux par lot. Sur la base de nos expériences antérieures, le nombre minimum d'animaux est de 8. Chaque lot comprendra 12 souris, 8 pour la protection et 4 pour l'analyse de la réponse cellulaire.

Pour les 5 protocoles, le nombre calculé d'animaux est de 336. Ce nombre sera moindre si dans l'un des protocoles il n'y a pas de protection (nombre minimum 132 souris dans le cas où aucune protection ne serait observée).

Les animaux sont hébergés dans une animalerie habilitée qui répond aux normes exigées.

429- Devant l'augmentation du nombre de cancer du sein détecté chaque année (53 000 nouveaux cas annuels), notre équipe a choisit de travailler à la mise au point de nouvelles molécules luminescentes à bases de lanthanides pour la détection des carcinomes mammaires.

Les principales techniques d'imageries utilisées actuellement pour le diagnostic (IRM, tomographie, PET...) sont très coûteuses en temps mais également en argent. L'imagerie de fluorescence n'est pas encore très utilisée en diagnostique. Pourtant elle offre une alternative et/ou complémentarité intéressante aux autres techniques couramment utilisées. En effet, l'imagerie de fluorescence est plus sensible, elle nécessite d'utiliser une quantité de marqueurs bien moindre que l'IRM ainsi qu'un équipement beaucoup moins coûteux.

Après de nombreuses études et des résultats très prometteurs au niveau cellulaire et notamment sur le modèle 4T1 (carcinome mammaire murin provenant d'un fond génétique BALB/C), nous avons sélectionné plusieurs molécules candidates pour étudier leur efficacité in vivo sur des souris femelles BALB/C (135 souris au total). Nos molécules sont dérivées de familles bien décrites dans la littérature (dendrimères et Metal-Organic Frameworks) comme non toxiques, non immunogènes et excrétées par voie urinaire. Cependant, la structure chimique ayant été modifiée, ces nouvelles molécules peuvent se comporter différemment et il est nécessaire de les étudier sur un organisme vivant entier.

Deux expériences sont envisagées ici :

- l'étude de toxicité à court et long terme de nos marqueurs. Cette étude se fera sur 4 lots de 5 souris (un lot court terme, un long terme et deux lots contrôles) ; Le nombre d'animaux prévu pour cette expérience est limité au minimum nécessaire pour déterminer la significativité statistique des résultats (n=5). Cette étude peut entraîner des douleurs chez l'animal mais il n'est pas envisageable d'utiliser un traitement pour l'atténuer car les signes de souffrance traduisant une éventuelle toxicité seront observés.

- L'étude de leur biodistribution par imagerie de fluorescence proche-infrarouge chez des souris porteuses de tumeurs 4T1. L'étude se portera sur 5 lots de 5 souris (un lot contrôle plus quatre lots correspondant à différents temps après injection : 2, 6, 12 et 24h). Nous ne pouvons pas réduire le nombre d'animaux pour cette expérience car nous souhaitons recouper les données obtenues par imagerie de fluorescence avec des analyses chimiques (par ICP) qui vont nous permettre de quantifier précisément les concentrations de lanthanide présentes dans chaque organe. C'est pourquoi nous utiliserons un lot de 5 souris par temps étudié.

Nous n'attendons pas d'effets néfastes sur les souris après injections de nos composés et allons vérifier cela par histologie. En ce qui concerne la biodistribution, nous nous attendons à voir dans un premier temps une accumulation dans certains tissus qui devrait décroître au cours du temps avec l'élimination des composés par les urines.

L'imagerie par fluorescence présente l'avantage d'être non invasive, non irradiante et sans douleur pour l'animal.

Nous espérons que nos marqueurs permettront de localiser de façon non ambiguë le signal provenant d'une tumeur primaire (à son stade de développement le plus précoce) grâce à l'efficacité de nos molécules combinée à la sensibilité de l'imagerie de fluorescence

430- Les champignons du genre *Aspergillus* sont des moisissures banales de l'environnement qui se propagent par l'intermédiaire de spores microscopiques ; elles peuvent infecter les mammifères (dont l'Homme) et les oiseaux, en général après inhalation de ces spores en suspension dans l'air. Les particularités anatomiques et physiologiques des oiseaux rendent ces animaux particulièrement réceptifs et sensibles aux aspergilloses. L'apparition des symptômes est souvent brutale et la mortalité liée à l'aspergillose reste élevée, même lors de

l'administration d'un traitement antifongique. Par ailleurs, la seule molécule antifongique utilisée dans les élevages aviaires (énilconazole) n'a pas d'autorisation de mise sur le marché pour l'emploi chez les oiseaux. Le développement de modèles animaux est indispensable pour améliorer le pronostic et permettre la mise en place plus précoce de méthodes de diagnostic et de protocoles de traitement. Compte tenu de l'importance économique de l'aspergillose chez la dinde (*Meleagris gallopavo*), espèce de volaille la plus sensible à l'aspergillose et la plus importante en France, il est pertinent d'utiliser des jeunes dindes comme modèle pour cette étude. Les objectifs de ce projet sont de développer et de valider un modèle d'aspergillose aiguë par nébulisation de spores aspergillaires dans la trachée de jeunes dindonneaux, puis d'évaluer l'efficacité de l'énilconazole.

Dans le but de limiter la taille des lots et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés, il est important d'obtenir un modèle expérimental avec un maximum d'animaux développant une aspergillose. Le nombre d'animaux minimal pour une étude statistique des résultats est de 10 animaux par lot, soit entre 200 et 380 dindonneaux utilisés pour ce projet. L'entretien des animaux sera quotidien et répondra aux besoins spécifiques des animaux de cet âge : accès à l'aliment et à l'eau, hygiène, contrôle de la température et de la photopériode. Les lots d'oiseaux sont maintenus dans des boxes de 2 m² dans une salle d'une animalerie de niveau L3. Les oiseaux seront suivis tout au long de l'expérimentation, à raison de deux observations tous les jours pour évaluer l'état de santé des animaux (pesée, observations de signes cliniques). Lorsque l'animal aura atteint le seuil de point critique, il sera euthanasié afin de réduire sa douleur.

431- Dans le projet présenté ici nous allons explorer la tolérance envers un traitement antimétabolique qui est le TAXOTERE (docetaxel) encapsulé chez le chien beagle.

La molécule du TAXOTERE est largement utilisée en chimiothérapie avec des résultats importants vis à vis de la régression tumorale mais aussi des effets secondaires majeurs.

L'encapsulation du TAXOTERE devrait permettre une réduction importante de la toxicité du principe actif (TAXOTERE) par un ciblage spécifique des cellules cancéreuses.

Dans la littérature, nous pouvons citer l'exemple du l'adriamycine, un traitement chimiothérapeutique utilisé contre certaines formes de cancer du sein avec des effets sur l'évolution tumorale. Cette même molécule encapsulée dans des vésicules et administrée chez les animaux donne des résultats différents de la forme libre (libération progressive du principe actif, biodégradation lente, diminution de la toxicité hépatique et sanguine du produit et l'effet le plus important était le ciblage des cellules cancéreuses à travers l'usage de la forme encapsulée).

Des essais menés chez des rongeurs (rats et souris) laissent envisager un mécanisme du même ordre avec le TAXOTERE. En revanche, l'évaluation de la toxicité aux doses habituelles est difficile dans ces espèces car elle nécessite le monitoring des grandes fonctions.

Dans le présent projet, qui concerne trois animaux (2 traités et un témoin), nous allons commencer par évaluer la faisabilité technique de l'administration et des explorations fonctionnelles avec un nombre réduit d'animaux, ensuite nous allons programmer une ou plusieurs études comparatives (augmenter le nombre d'animaux utilisés, usage des mâles et des femelles, inclure des groupes d'animaux recevant du TAXOTERE libre, etc.).

432- Contexte. La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement.

Cette technologie permet de remplacer certaines chirurgies par un geste totalement non invasif.

Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres ...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. L'équipe de recherche souhaite améliorer la technologie HIFU, notamment avec une meilleure maîtrise des dimensions et de la position précise des lésions thermiques dans tissus traités. Ceci sera nécessaire notamment pour des essais cliniques portant sur le cancer du sein.

Etat des recherches. Les essais ex-vivo ont déjà été effectués sur foie excisé. Mais ce modèle est limité par l'absence de vascularisation, l'absence de mouvements et l'absence de la paroi cutanée.

Le foie de lapin, traité par HIFU en voie externe, en application sous-costale, est un modèle animal connu des expérimentateurs. Dans toute l'expérience clinique avec la technologie HIFU aucune douleur post traitement n'a été observée chez les patients (prostate, thyroïde, vessie). De plus aucune infection n'est à craindre compte tenu du caractère extracorporel du traitement.

Objectifs: évaluer la précision et les dimensions des tissus coagulés par HIFU in vivo.

Matériels et méthodes: Les lapins seront anesthésiés et on appliquera l'énergie HIFU sur le foie par voie externe, sous costale. L'absence de vascularisation du tissu traité par HIFU sera constatée par scanner. L'euthanasie des animaux interviendra dans les heures suivant les lésions induites. Ils seront maintenus sous anesthésie entre le traitement et l'euthanasie. La portion de foie traité sera prélevée pour analyse macroscopique. Soixante lapins seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

433- L'imiquimod est un puissant immunomodulateur, connu pour induire localement une inflammation après une application topique. Il est utilisé chez l'homme pour le traitement de certaines pathologies cutanées comme les carcinomes baso-cellulaires, verrues et kératoses viro-induites. Cette molécule agit sur certaines cellules immunitaires exprimant le récepteur correspondant. L'utilisation de cet immunomodulateur dans le mélanome, cancer de la peau, reste encore peu explorée. Pourtant il présente un bon potentiel, car les cellules ciblées par cette molécule sont retrouvées au sein de ces tumeurs. Le projet consiste à évaluer in vivo les effets anti-tumoraux de l'imiquimod dans un modèle de souris « humanisées », porteuses d'un système immunitaire humain. Les études chez l'homme sont très limitées. Etant donné des différences importantes entre les systèmes immunitaires murins et humains, les études d'immunothérapie menées directement dans des modèles murins ne sont pas toujours extrapolables à l'homme. Le modèle des souris humanisées, souris reconstituées avec le système immunitaire et des tumeurs humaines, est un modèle de choix pour tester et élaborer de nouvelles stratégies d'immunothérapie anti-tumorale. Ce projet permettra une meilleure connaissance du mécanisme d'action de l'imiquimod en contexte tumoral et éventuellement de préconiser son utilisation dans le mélanome.

Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, ce qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité.

Ce projet nécessitera 40 animaux : nous réaliserons 2 expériences indépendantes avec 10 souris par groupe, 5 animaux/groupe seront analysés à 15 jours après le début du traitement, 5 animaux/groupe seront analysés 30 jours après le début du traitement. Ce nombre est réduit au minimum mais nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

434- Nombreuses études ont mis en évidence l'impact de l'exposition périnatale aux perturbateurs endocriniens. Pour des composés comme le bisphénol A (BPA) des études préliminaires, utilisant des approches globales pour voir les changements du métabolisme, suggèrent chez la souris que de faibles doses perturbent l'équilibre énergétique de l'organisme.

Le développement de l'obésité et du syndrome métabolique impliquent des facteurs génétiques et environnementaux. Cependant, cette susceptibilité génétique n'explique qu'une petite fraction de la sensibilité globale à l'obésité et n'explique pas l'augmentation de son incidence, qui est également associée aux régimes occidentaux généralement riches en énergie, lipides et sucres. Selon l'environnement fœtal, une réponse adaptative pourrait se mettre en place pour optimiser la croissance des organes clés (cerveau, cœur) au détriment d'autres organes tels que le muscle, le foie et le pancréas.

Objectifs:

Confirmer que facteurs nutritionnels et contaminants chimiques peuvent se conjuguer lors d'une exposition périnatale, pour moduler durablement le métabolisme et analyser cela dans le contexte des relations environnement-nutrition-santé via l'étude des effets d'un régime alimentaire (normal ou hypercalorique) et de l'exposition périnatale au BPA sur le développement du syndrome métabolique.

Méthodes:

Des rats Sprague-Dawley seront exposés à 3 doses de BPA pendant la période de gestation et jusqu'au le 15ème jour après la naissance (PND15). Les femelles seront nourries soit avec un régime normal (NF) soit avec un

régime riche en lipides (HF, 35% lipides): 9 animaux/groupe pour 2 régimes et 3 doses, soit 54 femelles gestantes.

Deux jours après la naissance (PND2), les portées seront alignées à 9 petits et un mâle et une femelle de chaque portée seront mis à mort pour des analyses du corps entier. A PND21 (sevrage), un mâle et une femelle de chaque portée seront mis à mort pour des analyses du sang et du foie. Après ce stade, 2 mâles de chaque portée seront conservés et hébergés en cages individuelles sans plus aucune exposition au BPA.

Pour chaque portée et régime maternel correspondant à un des 6 scénarii d'exposition prénatale, l'un des frères sera attribué au groupe nourri avec le régime NF, et l'autre au groupe nourri avec le régime HF, jusqu'à l'âge de 6 mois. Le nombre d'animaux par groupe a été déterminé (9 animaux/groupe) pour avoir une puissance statistique suffisante. A PND21, 60, 90, 120 et 180, tous les animaux subiront un test de tolérance au glucose, une analyse de composition corporelle et un échantillon de sang sera prélevé pour un bilan biochimique (glucose, insuline, lipides) et des analyses métabolomiques. A PND180, tous les animaux seront mis à mort pour prélever du sang et de tissus (mesures d'expression de gènes).

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation sur animal vivant pour ce type d'essai, notamment les suivis longitudinaux. De plus et dans le cadre du respect de la règle des 3Rs, les animaux de la descendance ainsi que les animaux soumis à reproduction non sélectionnés pour l'expérience seront réutilisés au sein de l'installation expérimentale de nutrition dans des expériences pilotes ou de formation du personnel.

435- Cette étude vise à démontrer l'intérêt des plasmas (gaz ionisés) froids hors équilibre à la pression atmosphérique comme nouvel agent anti tumoral en agissant sur l'angiogenèse tumorale (normalisation).

L'étude de l'activité anti-tumorale des plasmas a été très peu étudiée jusqu'à présent par la communauté scientifique et doit être documentée de manière plus importante pour être appliquée.

Dans un premier temps, l'activité anti-tumorale des plasmas a été évaluée in vitro et la compréhension des principaux mécanismes d'action des plasmas froids sur les cellules tumorales a bien avancé. En effet, certains médiateurs chimiques et protéiques susceptibles de moduler l'oxygénation des tissus ont été mis en évidence suite à l'effet du plasma. L'importante activité anti-tumorale du plasma démontrée in vitro sur différents modèles de cancer (colon, pancréas, poumon) nous suggère que le plasma froid pourrait avoir un fort potentiel in vivo.

Cependant, les dispositifs à plasma actuels présentent des limitations dans la facilité d'utilisation dans les traitements (distance à la cible, nécessité d'un statif, d'une surface plane).

Dans ce but a été développé un nouveau dispositif de plasma fibré, très flexible d'utilisation, potentiellement utilisable directement en thérapie et facilement dans un bloc opératoire. Son effet est actuellement en cours d'évaluation sur des cellules tumorales et les cellules endothéliales in vitro.

Des résultats de traitement de l'angiogenèse tumorale par normalisation des vaisseaux (notamment par rééquilibrage du niveau d'oxygène) ont été démontrés récemment. Suite aux premiers résultats de l'effet antitumoral du plasma in vivo sur des modèles de tumeurs chez la souris et sachant que le plasma a un effet sur les molécules reliées à l'oxygène il s'avère essentiel de vérifier l'hypothèse d'une normalisation par le plasma. Ceci ne peut être réalisé qu'in vivo puisque la normalisation des vaisseaux de la tumeur implique la complexité du microenvironnement et fait intervenir divers types de cellules.

Nous évaluerons l'effet du plasma fibré appliqué in vivo sur des souris saines et sur des souris porteuses de tumeurs mammaires dans un modèle orthoptique pour se rapprocher au mieux de la réalité. Le modèle de tumeur mammaire murine 4T1 a été choisi car il est bien maîtrisé au laboratoire, permet d'obtenir des tumeurs solides dont la taille n'évolue pas trop vite, donc compatible avec le temps de traitement envisagé (3 semaines maximum).

Les « doses » de plasma n'étant pas directement quantifiables, nous ferons varier la durée d'exposition. Les durées d'exposition au plasma fibré seront optimisées pour obtenir un effet maximum avec des doses minimales pour limiter les dommages potentiels et autres effets secondaires. Les effets du plasma sur l'oxygénation des tissus, l'état vasculaire, la taille des tumeurs, l'angiogenèse tumorale ainsi que la dissémination de métastases seront évalués et permettront de statuer sur son utilisation potentielle dans les traitements anticancéreux.

Les dommages qui pourraient être observés au cours des expériences sont: des brûlures sous l'effet du plasma, une souffrance due au développement des tumeurs. Le cas échéant, la souffrance et la douleur des animaux seront prises en charge.

Le projet prévoit l'utilisation de 100 à 190 souris selon l'ajustement dépendant des résultats obtenus.

436- Les nanoparticules à base de gadolinium AGuIX® ont démontré un potentiel en tant qu'agent diagnostique (imagerie) et radiosensibilisant (augmentation de l'effet de la radiothérapie localement). Cet effet permet d'envisager leur transfert en clinique dans certaines pathologies, dont le gliome, après injection intraveineuse. Nous souhaiterions mener des études sur des métastases cérébrales de mélanome afin de déterminer si cette pathologie pourrait être également visée en thérapie chez l'homme. Pour cet objectif, un certain nombre de lignées cellulaires possédant des caractéristiques génétiques différentes seraient concernées. Les cellules de souche murine ou provenant de lignées commerciales ou de patients (CHU Grenoble) seront implantées au niveau intracérébral chez la souris jeune (environ 3 semaines). En tenant compte des différentes lignées concernées (entre 4 et 6 lignées maximum), du nombre de groupe d'animaux (contrôle, irradiation seule, irradiation après administration de nanoparticules dose 1 et dose 2), du nombre d'animaux par groupe (n=10 souhaité), nous demandons une autorisation pour un maximum de 450 animaux (avec les essais de prise tumorale préalables). Afin de n'utiliser que le minimum d'animaux, chaque étude sera faite séparément et à chaque fois, le minimum d'animaux sera utilisé afin de réaliser une étude permettant l'analyse statistique des résultats.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une ANR, d'un financement ARC et INCa demandés en 2013.

437- Cette étude a pour objectif d'évaluer la biodispersion et de quantifier la présence de nanoparticules thérapeutiques dans deux modèles de pathologies hépatique chez le rat. L'injection de nanoparticules constitue un traitement anti-tumoral innovant pour une utilisation future chez l'homme.

Des études précédentes, que nous avons réalisées depuis plusieurs années, ont montré que les nanoparticules se concentraient principalement au niveau du foie après injection intraveineuse chez des rats sains. Cette étude permet donc d'évaluer l'éventuelle modification de la biodispersion des nanoparticules chez des animaux ayant une pathologie hépatique.

Cette étude permettra de déterminer s'il existe une modification de la biodispersion des nanoparticules chez des rats ayant une pathologie hépatique par rapport à celle observée chez les rats sains, et notamment si une accumulation plus importante au niveau de la rate, des reins, des poumons et du cerveau est observée.

Le recours à l'espèce rat est justifié pour pouvoir comparer les résultats de cette étude avec ceux obtenus lors des études de bio dispersion précédentes chez le rat sain.

Ces résultats permettront d'appréhender le comportement de ces nanoparticules en médecine humaine pour le traitement anti-tumoral chez les individus ayant une pathologie hépatique et ainsi de pouvoir moduler la dose à utiliser chez ces individus.

Pour atteindre cet objectif, deux modèles de pathologies hépatiques sont réalisés: modèle de fibrose hépatique par ligature du conduit biliaire et modèle d'insuffisance hépatique par hépatectomie partielle

Ces modèles par chirurgie sont nécessaires car ils permettent au mieux de mimer les pathologies hépatiques chez l'homme et ainsi pouvoir obtenir un modèle pathologique le plus proche de la pathologie humaine.

Le recours au scanner à rayons X permettra de réaliser un suivi in-vivo chez ces animaux en mesurant la biodispersion et la quantification de ces nanoparticules dans les organes cibles par l'évaluation de l'augmentation de la densité de ces organes (nanoparticules hyperdenses au scanner).

Le recours à l'imagerie permet de diminuer très significativement le nombre d'animaux utilisé dans l'étude en conservant chaque individu tout le long de l'étude, sans procéder à des sacrifices réguliers.

Ainsi des études statistiques pourront être réalisées en utilisant beaucoup moins d'animaux que par les modèles traditionnels sans imagerie.

Des critères d'interruption ou « points critiques» sont définis en période postopératoire ainsi que tout au long de l'étude ainsi que des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points critiques et essayer dans la mesure du possible de les traiter.

Actuellement, en l'état de la recherche, il n'existe pas de modèle in-vitro permettant de modéliser de manière fiable la biodispersion de ces nanoparticules dans un organisme animal.

438- Les dispositifs actuellement utilisés pour le remplacement de la voie de sortie du cœur droit (RVOT) chez les enfants atteints de malformations cardiaques, tels que les prothèses tubulaires, n'ont pas de potentiel de croissance et conduisent souvent à une voire plusieurs réopérations, avec le risque de complications post-opératoires.

Dans le but de trouver un matériau de remplacement de la RVOT idéal et utilisable dans la chirurgie des cardiopathies congénitales, divers supports créés par ingénierie tissulaire, composés de matériaux synthétiques

biorésorbables, biofonctionnalisés, c'est-à-dire ensemencés à l'aide de cellules souches adultes ou sur lesquels ont été greffés des protéines qui en miment les effets (motifs peptidiques), ont été testés chez l'animal. Ce projet de recherche fait suite à trois précédentes études. Les deux premières études avaient pour but de restaurer une RVOT fonctionnelle dans un modèle de gros animal en croissance, par l'utilisation de deux matériaux biorésorbables ensemencés de deux types différents de cellules souches adultes. La troisième étude avait pour but d'étudier l'effet d'un remplacement partiel de veine cave inférieure (VCI) sous rénale chez le rat Wistar par deux polymères biodégradables différents non ensemencés. La disparition rapide des cellules greffées sur les polymères dans les deux premières études, et la reconstitution d'un néo-vaisseau fonctionnel sans greffe de cellules préalable dans la troisième étude, nous ont menés à la décision de tester le remplacement des cellules souches par des motifs peptidiques seuls, susceptibles d'induire les mêmes effets chémoattractants et d'aboutir à une recolonisation identique du matériau par les cellules de l'hôte. Nous avons donc choisi de tester les effets d'une fonctionnalisation du Polydioxanone (PDO) par le motif peptidique nommé RGD, peptide présent dans de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire et qui représente un site d'adhésion pour les cellules. A titre de contrôle, cette fonctionnalisation peptidique sera comparée à une fonctionnalisation par des cellules souches adultes dérivées du tissu adipeux (ADSC, Adipose-Derived Stem Cells). Des patches de PDO biofonctionnalisés soit par les cellules souches soit par le RGD seront implantés sur la VCI sous-rénale de rats immunodéficients (nudes). Dans un souci de respect de la règle des 3R et donc de la réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, il a été défini par analyse statistique qu'un effectif minimum de 14 rats par groupe, soit un total de 28 rats, serait nécessaire pour réaliser un test de non infériorité. Cet effectif sera porté à 34 pour tenir compte d'une mortalité potentielle de 3 animaux par groupe. Nous étudierons les capacités d'endothélialisation, de restauration d'une néo-VCI fonctionnelle, ainsi que la réaction inflammatoire des deux types de fonctionnalisation à six semaines et à trois mois dans le but de déterminer la meilleure technique de biofonctionnalisation du matériau. Le but à terme, est de recréer, grâce à la sélection du matériau et de la technique de biofonctionnalisation, une valve pulmonaire capable de grandir avec l'enfant et lui offrir une vie sans réintervention chirurgicale.

439- Le recours à des mammifères - souris, rats-, adaptés aux conditions de la captivité au sein d'animaleries, est encore incontournable pour identifier et puis caractériser les processus séquentiels et très dynamiques rendant compte :

i) soit de l'ontogenèse

ii) soit du remodelage physiologique de la structure et des fonctions du système immunitaire humain i) post la naissance et puis ii) aux différentes transitions physiologiques-sevrage, période de reproduction ..., ce d'autant plus qu'à ce système multifocal contribuent de nombreux lignages cellulaires dont le lignage des cellules lymphoïdes innées/ILCs. Le récepteur nucléaire ROR γ t a permis d'identifier une famille de cellules lymphoïdes innées, les cellules ROR γ t+ ILCs qui seront désignées par l'acronyme suivant ROR γ t+ ILCs

En outre, avant d'explicitier les objectifs du projet pour lequel est sollicitée la présente demande d'autorisation, le concepteur du dit projet estime qu'il est pertinent de préciser les points suivants: post la naissance, il est essentiel d'appréhender que contribuent à l'organisme complexe qu'est tout jeune mammifère non autonome, deux grandes classes de tissus/systèmes, ce selon qu'ils sont colonisés ou pas par des microbes symbiontes/commensaux que nous désignerons par le terme microbiote. L'une des premières fonctions des ROR γ t+ ILCs est de contribuer, avec les cellules épithéliales, à maintenir ces communautés microbiennes et à prévenir leur dissémination dans les tissus stériles sous-jacents. Il est biologiquement pertinent de considérer que les cellules de ce lignage opèrent comme sources d'agonistes que détectent les lymphocytes T et B naïfs ou supports de la mémoire et que de l'activation des voies de signalisation en aval puissent témoigner, au niveau des tissus stériles colonisées par des bactéries invasives ou des virus, la clairance plus rapide de ces microbes, et l'atténuation plus rapide des dommages.

Contrairement aux lymphocytes T ROR γ t+, les ROR γ t+ ILCs n'expriment pas de récepteur pour l'antigène – i.e., le complexe « allèle du complexe majeur d'histocompatibilité-peptide microbien », mais réagissent promptement, en quelques heures, à des agonistes du microbe invasif ou à des agonistes endogènes témoignant de dommages tissulaires.

L'objectif de ce projet est d'établir le rôle spécifique des cellules ROR γ t+ ILCs au sein du système immunitaire dans son ensemble, et plus particulièrement par rapport aux réponses adaptatives dépendantes des lymphocytes B et T. Nous espérons ainsi dégager les processus rendant compte des propriétés des ROR γ t+ ILCs,

non seulement à l'initiation mais aussi plus tardivement quand interviennent les lymphocytes T qui expriment des récepteurs pour l'antigène.

Le développement de ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique a été et/ou sera génétiquement modifié afin de pouvoir suivre et éliminer, conditionnellement, les cellules ROR γ t+ ILCs.

Pour les quatre procédures qui seront mises en œuvre pour explorer et caractériser in vivo le rôle des ROR γ t+ ILCs, nous estimons à 1880 l'effectif de la population de différentes lignées de souris en expérimentation, ce, en minimisant l'inconfort et le mal être.

440- Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon. A des stades avancés de la maladie, les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité.

Nous avons établi des modèles de xénogreffes de tumeur de l'ovaire, obtenus directement à partir des fragments de tumeurs de patients implantées sur les souris immunodéprimées.

La présence d'une protéine, est mise en évidence à la surface des cellules cancéreuses de l'ovaire. Notre but est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale d'un anticorps reconnaissant spécifiquement cette protéine.

La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité de l'anticorps seul ou associé à la chimiothérapie. La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité de l'anticorps sur les xénogreffes obtenues à partir des tumeurs ovariennes humaines.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre de souris utilisées est de 496 souris. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences

441- Face à l'explosion de l'obésité et des maladies métaboliques associées, il est essentiel de cerner l'importance de la nutrition sur les mécanismes de prise de poids et d'en comprendre les conséquences sur le métabolisme. L'augmentation de la masse grasse lors du surpoids et de l'obésité favorise l'apparition de pathologies métaboliques comme l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Il est aujourd'hui reconnu que l'équilibre entre les acides gras selon leur nature chimique, plus que leur quantité absolue, est impliqué dans la physiopathologie des maladies métaboliques chroniques (« Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras » AFSSA, saisine n° 2006-SA-0359, mars 2010). En moyenne, malgré les différences régionales, les régimes alimentaires européens sont caractérisés par des apports élevés en acides gras saturés (AGS) et en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6, et par de faibles apports en acides gras monoinsaturés (AGMI) et en AGPI n-3. Peu d'études ont été menées aujourd'hui pour comparer les effets propres à chaque AGPI n-3, l'objectif principal du projet est de comparer les effets des principaux AGPI n-3 (ALA vs. EPA vs. DHA) sur l'obésité et le syndrome métabolique. Nous avons pour cela besoin de soumettre 40 souris O/Ob à un régime de type High Fat par comparaison à 20 animaux nourris avec un régime standard. Parmi les animaux recevant le régime hyperlipidique certains seront supplémentés avec un ou plusieurs acides gras d'intérêt à hauteur de 1% du poids du régime (soit 2% de l'apport énergétique total, AET).

442- Des défauts du développement cortical peuvent se vérifier chez l'Homme en âge prénatal et sont connues sous le terme de dysplasie corticale. Elles consistent en des changements permanents de structures cérébrales en réponse à différents facteurs intrinsèques ou extérieurs, pour la plus part inconnus. Les conséquences de la dysplasie corticale ou malformation cérébrale sont très graves, diverses et peuvent inclure l'épilepsie pharmaco-résistante, le retard mental, la schizophrénie, etc... La dysplasie corticale peut être reproduite chez l'animal afin d'en étudier ses causes et son développement. Par exemple, des travaux scientifiques antérieurs ont montré que l'utilisation du méthylazoxyméthanol (MAM) a des effets néfastes sur la prolifération et la migration neuronale pendant la période prénatale et induit un développement neurovasculaire aberrant. Le MAM est un agent alkylant qui interfère avec la mitose cellulaire; son mécanisme est commun à d'autres agents chimiothérapeutiques.

De façon intéressante, des problèmes de prolifération neurovasculaire altérée sont communément observés chez des patients souffrant de crises épileptiques pharmaco-résistantes. L'utilisation d'un modèle rongeur de malformation du développement cortical présente une valeur immédiate en recherche translationnelle et clinique. Nous proposons d'utiliser un modèle de malformation cérébrale chez le rongeur associé à des crises (telles que les crises induites par la pilocarpine, l'acide kaïnique, le pentylenetétrazole) afin d'étudier les

mécanismes qui sous-tendent les altérations neurovasculaires et leur pertinence dans le maintien des crises. En particulier, nous allons étudier l'interaction entre barrière hémato-encéphalique, astrocytes et péricytes, les principaux acteurs neurovasculaires. Nous étudierons l'expression et la fonction des jonctions adhérentes entre péricytes et cellules endothéliales. Nous évaluerons l'effet d'insultes doubles, telles que celles induites par le traitement en prénatal avec le MAM et les crises induites en post-natal. Pour cette étude nous prévoyons l'utilisation de la progéniture de 32 souris et 32 rattes, traitées ou pas avec l'agent neurotoxique MAM. Cette étude est corroborée par de nombreuses découvertes récentes qui indiquent que la barrière hémato-encéphalique (ou BBB) est essentielle dans la régulation de l'activité épileptique. L'utilisation d'un modèle de malformation neurovasculaire permettra de mieux comprendre les mécanismes des crises induites par la BBB et apportera un outil translationnel pour l'évaluation de nouvelles cibles anti-épileptiques potentielles.

443- La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Parmi les causes principales de cécité, la rétinite pigmentaire désigne un ensemble de pathologies progressives et héréditaires de la rétine qui mène à une cécité incurable et qui atteint plus d'un million de personnes à travers le monde. Dans ce projet, nous testons un nouveau traitement applicable à la rétinite pigmentaire qui consiste en une unique injection intraoculaire. L'objectif est d'étudier l'activité cérébrale des animaux traités afin d'évaluer la qualité de la vision retrouvée après le traitement. Pour cette étude, un total de 288 rats et 288 souris seront utilisés.

444- Notre laboratoire a développé une thématique importante d'étude du rôle des bactéries du microbiote intestinal humain dans l'obésité. Les germes cultivables du microbiote intestinal sont limités aux entérobactéries, levures et certaines bactéries anaérobies telles que les Clostridies. Pourtant différentes études de biologie moléculaire démontrent que le microbiote intestinal est composé d'environ 1000 espèces bactériennes dont près de 99% d'anaérobies qui définissent 3 entérotypes dominés par une bactérie du genre Bactéroidetes, Prévotella ou Ruminococcus. De nombreuses bactéries du microbiote intestinal sont des bactéries dont la culture est fastidieuse, nécessitant des milieux non encore définis. Les milieux classiques sont trop sélectifs ou vite envahis par les entérobactéries. Le liquide d'ascite est un bon milieu de culture car il contient peu de complément et par conséquent il a un pouvoir d'opsonisation et bactéricide faible. L'inoculation à la souris ascitique d'une suspension de selles contenant différentes bactéries pourrait permettre le développement de toutes les espèces bactériennes. Le liquide serait ponctionné puisensemencé dans le but d'isoler de nouvelles bactéries cultivables.

445- En volailles de chair, l'alimentation protéique est essentiellement basée sur une incorporation de protéines végétales que l'on peut facilement réduire à une utilisation quasi-totale de tourteau de soja importé. La réduction des taux protéiques des rations, associée à une meilleure adéquation entre les besoins de l'animal et les apports alimentaires, ainsi que le recours à des procédés d'amélioration de la digestibilité de la fraction protéique ont pour effet de réduire les rejets azotés dans l'environnement, tout en conservant des performances économiquement viables. Dans un contexte européen de réduction de l'antibiothérapie en élevage, la réduction des taux protéiques alimentaires (notamment de la fraction protéique indigestible) a un impact positif sur l'état de santé de l'animal (entérite nécrotique, qualité des litières...).

Il est donc crucial d'élaborer des stratégies alimentaires qui permettront de diminuer l'apport en protéines dans les rations des volailles et d'augmenter l'efficacité de transformation des protéines ingérées en protéines musculaires. Ces stratégies doivent être conduites parallèlement à la recherche de sources de protéines diversifiées et produites localement : colza, tournesol, protéagineux.

Une des voies d'amélioration de la digestibilité de la fraction protéique consiste à ajouter une protéase dans l'aliment complet des volailles. Des mesures in vitro ont permis de sélectionner des produits efficaces sur les matières utilisées en nutrition animale et dans des conditions de milieu compatibles avec le tractus digestif des volailles (pH, température notamment). Leur utilisation pratique doit être validée par des essais sur les espèces cibles et dans les conditions réelles d'élevage et d'alimentation.

Ce projet vise à évaluer l'effet d'une protéase exogène chez la dinde domestique (*Meleagris gallopavo*), espèce dont la consommation est importante en France et pour laquelle aucune référence n'est disponible. Il porte sur 924 animaux et comprend deux volets simultanés : d'une part un suivi des performances, d'autre part la réalisation de bilan digestif pour quantifier l'impact environnemental. Pour le premier volet, 888 dindes seront élevées dans 24 parquets de 36 animaux en conditions d'élevage conventionnelles, pendant 12 semaines, avec un contrôle des performances à 29, 57 et 85 jours d'âge; Les 24 parquets sont distribués aléatoirement en 3

groupes expérimentaux (8 parquets de 36 animaux par groupe) : un groupe reçoit un aliment témoin répondant aux besoins des animaux, un second groupe un aliment sub-carencé en protéine, le troisième l'aliment sub-carencé supplémenté en protéase. Pour le second volet, 36 animaux répartis en 3 groupes expérimentaux (identiques à ceux du volet 1) de 12 sont placés en cages individuelle de 9 jours à 24 jours d'âge, pour évaluer l'effet de l'addition de protéase sur la digestibilité du régime alimentaire et la réduction des rejets azotés.

446- Cette étude aborde des questions fondamentales concernant le concept de vaccination.

C'est sur le principe de mémoire immunitaire que les vaccins sont réalisés. Les lymphocytes B à mémoire ont pour rôle de mémoriser les propriétés de l'antigène les ayant activés, pour une réponse plus rapide lors d'une seconde infection par ce même antigène. Ils ont une longue durée de vie, peuvent persister plus de 50 ans chez l'homme. Cependant les mécanismes demeurent encore mal connus.

L'étude de cellules B à mémoire, qui implique la physiologie de la réponse immune, ne peut être effectuée que chez l'animal in vivo et le modèle le plus simple est la souris. Le but du projet est l'étude de la mémoire immunitaire B dans un modèle de souris qui permet un marquage intrinsèque des cellules impliquées dans la réponse immune. La lignée de souris: AID-EYFP, permet l'expression stable de la protéine fluorescente EYFP (par excision des sites loxP) dans les cellules engagées dans la réponse immune grâce à l'expression de l'enzyme Cre qui est régulée par le promoteur de l'AID (activation-induced cytidine deaminase). L'AID est une protéine exprimée de manière spécifique au cours de la réponse immune, responsable de la commutation isotypique et du processus d'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines. L'enzyme Cre est exprimée en fusion avec le récepteur pour les œstrogènes ERT2 et son activation est dépendante de l'administration du tamoxifène.

Ce modèle, généré dans notre unité, sera utilisé pour:

A) étudier la réponse immune dans trois cas d'infection virale:

B) étudier l'impact de molécules affectant spécifiquement le processus de la réponse immune sur les différentes sous-populations de cellules B à mémoire.

C) étudier la fonctionnalité des différentes sous-populations cellulaires générées au cours d'une immunisation, systémique ou mucoale, d'une infection virale, ou après traitements interférant avec les processus immuns normaux.

Les souris seront immunisées par injections intra-péritonéales (ou par voie orale, dans le cas d'une immunisation mucoale). Le tamoxifène est donné par gavage 7 et 12 jours après la première immunisation et 1 jour après la deuxième immunisation. Les souris seront ensuite sacrifiées dans une chambre à CO2 entre 1 mois et 12 mois après immunisation. Nous prélèverons la rate, où la majorité des cellules spécifiques pour l'antigène résident, les plaques de Peyer, la moelle osseuse et le sang afin de caractériser les cellules mémoires. Pour l'ensemble de l'étude 230 souris seront utilisées.

447- Le projet prévoit l'étude du développement du système immunitaire humain grâce à la création d'un nouveau modèle de souris « HIS » (pour Human Immune System) à partir de deux lignées immuno-déficientes déjà existantes: une lignée déficiente en RAG2 et une lignée déficiente en IL15Ra. Les molécules RAG2 et IL15Ra étant essentielles pour le développement des lymphocytes T, B et NK de la souris. En croisant ces deux lignées de souris entre elles, nous avons obtenus des souris doubles-déficientes en RAG2 et IL15Ra, capables d'accepter sans rejet la greffe de cellules humaines. Il sera donc possible de reconstituer un système immunitaire humain dans ces souris par injection de cellules souches hématopoïétiques humaines dans le foie des souris nouveau-nées qui seront ensuite sacrifiées à 2 mois pour étudier la reconstitution immunitaire. L'originalité de ce modèle réside dans le fait qu'il conserve développement des tissus lymphoïdes associés à l'intestin le fait qu'il conserve le développement des tissus lymphoïdes associés à l'intestin ceux-ci jouant un rôle important dans l'homéostasie du système immunitaire. Nous étudierons le comportement du système immunitaire humain en réponse à des vaccins anti-pneumocoque utilisés chez l'homme (Pneumovax, Prevenar). L'étude des tissus lymphoïdes reconstitués en fonction des modifications apportées in vitro aux cellules souches humaines (inactivation ou surexpression de gènes spécifiques) est aussi envisagée dans ce projet.

Le nombre d'animaux prévus pour ce projet est de 30 par an sur 5 ans, soit un total de 150 pour toute la durée du projet.

448- L'obésité représente un problème de santé publique croissant dans notre société.

L'étude des mécanismes biologiques à la base de la régulation de la prise alimentaire, et plus largement du métabolisme énergétique, devrait nous permettre de mieux appréhender cette pathologie. Il s'agit d'apporter de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique ou d'établir de nouvelles recommandations nutritionnelles afin de mieux prendre en charge cette maladie. Nos études sont focalisées sur le fonctionnement cérébral et visent à déterminer comment sont perçus et intégrés les différents signaux endogènes métaboliques et sensoriels impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Un dysfonctionnement au niveau des aires cérébrales contrôlant l'appétit lié à une mauvaise perception et intégration des signaux de satiétés semble être un facteur à risque d'obésité. Dans ce projet, nous poursuivons trois objectifs. 1. Nous souhaitons démontrer que la qualité et la quantité des nutriments ingérés modifient en permanence et de manière naturelle, physiologique, la structure des réseaux neuronaux de l'hypothalamus. 2. Nous voulons prouver que ce remodelage neuronal est adapté et participe à la régulation de la prise alimentaire et au maintien de l'homéostasie énergétique. 3. Nous pensons qu'un défaut dans la mise en œuvre de cette plasticité cérébrale induite par l'alimentation pourrait être responsable de troubles de l'alimentation et de pathologies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2.

449- L'obésité représente un problème de santé publique croissant dans notre société. L'étude des mécanismes biologiques à la base de la régulation de la prise alimentaire, et plus largement du métabolisme énergétique, devrait nous permettre de mieux appréhender cette pathologie. Il s'agit d'apporter de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique afin de mieux prendre en charge cette maladie. Nos études sont focalisées sur le fonctionnement cérébral et visent à déterminer comment sont perçus et intégrés les différents signaux endogènes métaboliques et sensoriels impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Un dysfonctionnement au niveau des aires cérébrales contrôlant l'appétit lié à une mauvaise perception et intégration des signaux de satiétés semble être un facteur à risque d'obésité. L'hypothalamus est une région cérébrale majeure impliquée dans l'intégration de ces signaux. Nous venons d'identifier MOF comme une molécule activée rapidement dans l'hypothalamus de souris suite à un changement de régime alimentaire. Dans ce projet, nous souhaitons étudier le rôle de MOF dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids. Il s'agit 1) d'étudier les mécanismes qui permettent d'activer MOF (identification des médiateurs biologiques, des voies de signalisation), 2) de bloquer son activité pour évaluer son rôle dans le contrôle de la prise alimentaire et le maintien du poids corporel. Ces études seront menées chez la souris (*mus musculus*), et nécessiteront environ 250 animaux.

450- Le but du projet est d'étudier la trypanosomose africaine due à plusieurs souches aiguës ou silencieuses de *T. gambiense*, *brucei* et *congolense*. En particulier, nous voulons localiser les parasites dans les organes de souris infectées et étudier la réaction inflammatoire au niveau histologique et immunitaire. Certains parasites utilisés seront modifiés génétiquement pour exprimer des gènes rapporteurs afin de pouvoir suivre l'infection et leur localisation tissulaire. Afin de mieux comprendre la pathologie induite dans la trypanosomose, nous utiliserons plusieurs lignées de souris avec des fonds génétiques différents avec des sensibilités différentes à l'infection (CD 1, balb/c, C57bl6/J). Nous allons également utiliser des souris KO pour la iNO synthase et le TNF. En effet, la NO synthase et le TNF sont connus pour participer à la réaction inflammatoire induite par les parasites. Ainsi 1800 animaux seront nécessaires pour ce projet qui durera 5 ans.

451- (i) Contexte et objectifs. Selon les dernières statistiques de l'OMS, c'est dans la catégorie des infections dues aux champignons et parasites qui colonisent les revêtements muqueux que l'on recrute la grande majorité des «nouveaux» opportunistes. A l'heure actuelle, la lutte contre ce type d'infections consiste à agir tant au niveau curatif, que sur le plan préventif. Ainsi, l'objectif de ce projet est de développer des nouvelles stratégies de formulation pour traiter les infections fongiques et parasitaires émergentes qui colonisent les muqueuses principalement buccales et vaginales et ouvrir des perspectives pour la protection locale des malades immunodéficients au cours de leur hospitalisation. Pour atteindre cet objectif, notre stratégie consiste à développer une formulation à la fois thermosensible et mucoadhésive.

(ii) Résultats attendus. Cet hydrogel est thermosensible. Il présente la propriété d'être à l'état liquide à température ambiante, facilitant ainsi son administration, et à l'état gel après son administration (à 37°C). Ainsi, cet hydrogel sera capable de tapisser les muqueuses colonisées pour assurer une libération prolongée dans le temps des principes actifs. L'activité des formulations sera évaluée sur des modèles d'infections buccales et vaginales à *Candida albicans* chez la souris C57/bl6. 200 souris seront employées

452- Contexte et objectifs. Le but est de développer de nouvelles formulations galéniques contenant à la fois amphotéricine B et miltéfosine, toutes deux actives vis-à-vis de la leishmaniose viscérale en améliorant leur biodisponibilité et leur efficacité parasiticide. Les formulations actuelles contiennent seulement de l'amphotéricine B (Fungizone® et AmBisome®) et ne peuvent être données que par voie parentérale; de plus la seconde est très chère pour une maladie sévissant surtout dans les pays en voie de développement. L'efficacité des nouvelles formulations sera vérifiée sur le modèle souris mis au point par S. L. Croft, (London School of Tropical Medicine and hygiene) et sur lequel ont été découverts l'efficacité leishmanicide de la Fungizone® (amphotéricine B déoxycholate), de l'AmBisome® (amphotéricine B) et de l'impavido® (miltéfosine) qui sont actuellement employés pour traiter les malades.

Résultats attendus. Nous espérons que les formulations permettront un passage de la barrière intestinale à l'amphotéricine B ouvrant ainsi la voie au traitement de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un traitement par voie orale à plus faible coût et d'une administration au malade plus facile. Ce projet utilisera 160 souris femelles Balb/c

453- La découverte récente de l'activité neurogénique dans le cerveau adulte constitue une avancée considérable en neurobiologie et offre de l'espoir dans la mise en place des nouvelles approches de traitement des maladies neurodégénératives. La niche des cellules souches qui génère un flux des neurones a été décrite chez de nombreuses espèces dans deux régions du cerveau adulte : la zone sous-ventriculaire du mur latéral (SVZ) et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (SGZ). Malgré des progrès spectaculaires sur la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ce phénomène plusieurs aspects sont sujets de controverses, ce qui est lié en grande partie à la difficulté de marquer et donc de visualiser, isoler et manipuler les cellules souches neurales adultes.

Notre laboratoire a identifié le gène PRSS56 comme marqueur des cellules souches neurales. Nous avons récemment généré une lignée de souris portant l'insertion de du gène codant pour la recombinaison Cre au locus de PRSS56 (PRSS56Cre). L'utilisation de cette lignée en combinaison avec des souris rapportrices (l'expression du gène rapporteur est activable par la Cre) nous a permis de détecter les cellules marquées dans le cerveau adulte au niveau de la SVZ et la SGZ ce qui laisse penser qu'il s'agit d'un marqueur spécifique de la neurogenèse postnatale. La disponibilité d'un tel marqueur nous permettrait d'isoler, purifier et caractériser les cellules souches neurales ainsi que leurs dérivées et ceci tant en situation physiologique que suite à un trauma. Notre projet comporte trois parties. Dans la première, nous établirons le profil d'expression de PRSS56 dans le cerveau adulte, procéderons à la caractérisation cellulaire et moléculaire des cellules qui l'expriment et rechercherons le phénotype attaché à la mutation du gène PRSS56 dans le système nerveux central. Dans la deuxième, nous utiliserons un système de culture des cellules souches, ou des tranches de cerveau afin d'étudier leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation. Dans la dernière partie nous utiliserons la lignée PRSS56Cre comme outil de détection des cellules souches neurales adultes ainsi que de leurs dérivées et ceci en situation physiologique et à la suite d'une lésion ischémique du cerveau. Ces expériences nous permettront d'aborder des questions portant sur la distribution et les propriétés des cellules souches tracées au sein de la niche et l'évolution de cette dernière au cours du vieillissement. La possibilité de visualiser les cellules souches et de leurs dérivées à différentes périodes post-ischémiques nous permettra de mettre en évidence leur éventuelle implication dans les mécanismes de régénération.

Les résultats de cette étude devrait nous apporter des renseignements précieux sur la biologie des cellules souches neurales adultes et sur la spécificité du marqueur PRSS56 pour identifier, manipuler et caractériser les cellules souches chez la souris et à plus long terme chez l'homme. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation d'environ 238 souris transgéniques à différents stades de développement.

454- La réalisation du présent projet intervient dans le cadre d'un besoin sociétal croissant concernant la prise en charge des individus vieillissants et s'inscrit dans la thématique générale du développement de stratégies curatives visant à empêcher le déclin ou à améliorer la mémoire des individus âgés. Ce projet sera réalisé en collaboration avec un industriel pharmaceutique afin de réaliser une étude préclinique avec composé pharmacologique dans un test comportemental que nous avons développé au sein de notre équipe de recherche. Ce projet a pour objectif de réaliser un effet dose du composé pharmacologique afin de voir s'il permet d'améliorer un type particulier de mémoire déficient chez des individus âgés et chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer, et ensuite d'en observer les effets sur l'activité cérébrale sous-jacente lors de la phase de mémorisation. L'avantage évident de ce projet est de confirmer ou d'infirmer de nouvelles pistes médicamenteuses en cours de développement, mais nécessite le recours à l'expérimentation animale.

Cette étude sollicite un modèle comportemental, développé au sein de l'équipe au cours des 15 dernières années, permettant de modéliser un type de mémoire atteint au cours du vieillissement normal et pathologique chez la souris. Les animaux utilisés dans cette étude seront donc des souris au nombre de 360 issues d'un centre d'élevage agréé. L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons :

- 1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus de mémorisation. En effet, ce type d'étude repose sur l'analyse du comportement animal et nécessite d'avoir une espèce suffisamment proche de l'espèce humaine pour en extrapoler les résultats.
- 2) L'organisation du système nerveux central de ces animaux est suffisamment proche de celle de l'homme pour permettre une extrapolation acceptable des résultats obtenus à l'espèce humaine.
- 3) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et les appareils comportementaux sont dimensionnés pour cette espèce.

Dans la mesure où le remplacement n'est pas envisageable à l'heure actuelle sur ce type d'études, nous nous efforcerons à honorer les deux autres points qui sont le raffinement et la réduction. Dans notre cas, si la première étude consistant à réaliser un effet dose d'un composé pharmacologique sur la mémoire ne se révèle pas concluante, la seconde étude consistant à observer les effets du composé sur l'activité cérébrale ne sera pas envisagée. De plus, la réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne.

455- Au cours du vieillissement, une diminution de la réponse immunitaire est observée (immunosénescence). Les personnes âgées sont ainsi plus exposées aux infections sévères. Un autre effet marquant lié à l'âge est le vieillissement musculaire, ou sarcopénie définie comme une perte de force et de masse musculaire. Le vieillissement musculaire aboutit à une réduction de la mobilité des personnes âgées. Le système immunitaire est un acteur important de la santé musculaire. Des études montrent l'existence d'un dialogue entre les cellules musculaires et immunitaires nécessaire à la régénération du muscle, ce dialogue étant altéré avec l'âge. Avec l'âge, un déficit en vitamine D est observé. Or, le système immunitaire et le muscle sont des cibles de cette vitamine. Celle-ci est connue pour stimuler la fonction immunitaire. En parallèle, une corrélation positive entre la concentration plasmatique de vitamine D et la force et/ou la fonction musculaire a été établie. Enfin, elle potentialise la différenciation des cellules musculaires. Au vu de ces données, notre but est d'étudier, chez le rat âgé ayant subi une lésion musculaire, les effets d'une déplétion et d'une supplémentation en vitamine D sur :

- 1- la synthèse protéique et la régénération musculaire, connues comme étant diminuée avec l'âge ;
- 2- les caractéristiques des cellules immunitaires circulantes, locorégionales (ganglions) et infiltrées au sein du muscle lésé.

Ce projet permettra de recueillir de nouvelles données sur le bénéfice d'une supplémentation en vitamine D, dans la prévention des déficiences immunitaires et musculaires chez le sujet âgé.

Une étude in vitro ne permettrait qu'une approche non-physiologique de l'effet de la vitamine D sur le dialogue cellule immunitaire/cellules musculaires. Les études cliniques ne sont pas concevables car une carence en vitamine D et une souffrance musculaire doivent être induites. Le modèle animal nous permettra d'étudier l'effet de la vitamine D sur le dialogue cellule immunitaire/cellule musculaire dans un système complexe et physiologique. Pour répondre à notre objectif, 72 rats mâle Wistar âgés (18 mois) seront carencés ou supplémentés en vitamine D : 24 rats seront maintenus soit sous un régime de maintien, soit sous un régime dépourvu de vitamine D, soit sous un régime enrichi en vitamine D, pendant 3 mois. Pour contrôler la synthèse cutanée de vitamine D, les 3 lots de rats seront éclairés par des néons ne produisant pas d'UVB.

Après 3 mois de régime, les rats subiront une lésion musculaire par injection d'une myotoxine, la notexine, et la régénération musculaire sera suivie durant le mois suivant. 24 rats mâles jeunes (2 mois), soumis à un régime de maintien, seront injectés avec la notexine. Ils serviront de contrôle pour l'étude de l'effet du vieillissement sur la régénération musculaire. Le statut en vitamine D ainsi que la composition corporelle seront mesurés en début de protocole, 3 mois après le début et en fin de protocole. Au cours de la période de régénération, la synthèse protéique musculaire et l'infiltration immunitaire seront évaluées.

456- Les plaies cutanées sont des ruptures de la barrière cutanée qui, si elles sont mal soignées, peuvent aboutir à des complications. On distingue 2 types de plaies:

- la plaie simple: effraction cutanée superficielle et peu étendue (coupure légère, piqûre, éraflure ...), saignant peu et située à distance de l'œil ou d'un orifice naturel,

- la plaie grave = en fonction de sa localisation, près d'un orifice naturel, au niveau du thorax ou de l'abdomen, de l'extrémité d'un membre ..., de son aspect, saignement abondant, profondeur, bords irréguliers, présence et types de sécrétions ..., de son origine, projectile, morsure, objet tranchant..., et de sa durée, devenant alors une plaie chronique, une plaie étant considérée comme chronique après 4 à 6 semaines d'évolution en fonction de l'étiologie. Elles regroupent pour l'essentiel les ulcères de jambe (veineux, artériels ou mixtes, et l'angiodermite nécrotique), les escarres et les plaies du pied diabétique.

Les plaies chroniques représentent un problème de santé publique important puisque, selon les projections de la Haute autorité de Santé à partir d'études étrangères, il y aurait en France de 28 000 à 39 500 patients atteints d'ulcère de jambe, 35 000 diabétiques présentant une plaie du pied et on dénombrerait 300 000 escarres. Leur prise en charge induit encore des coûts importants de par la chronicité de ces plaies.

Les soins sont prolongés, le matériel est parfois coûteux, le temps infirmier nécessaire est important, les arrêts de travail et les hospitalisations sont longues. D'autre part, ces plaies chroniques ont toujours un retentissement majeur sur la qualité de vie du patient. Elles diminuent leur autonomie et leur liberté et les obligent à modifier leur mode de vie, sans compter la modification de l'image que le patient a de lui-même et celle qu'il présente aux autres, constituant une véritable « blessure narcissique » et contribuant à son isolement social. L'ensemble de ces facteurs, associé à la douleur éventuelle, au sentiment d'impuissance devant cette plaie ne guérissant pas, contribue à engendrer anxiété et syndrome dépressif, reconnus comme étant des freins à une bonne cicatrisation.

La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la zone lésée. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin: l'angiogenèse avec formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants par bourgeonnement et permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

La durée de cicatrisation dépend de la nature et de la gravité de la lésion. Les patients diabétiques présentent fréquemment des retards de cicatrisation. Le maintien d'une glycémie normale paraît essentiel pour une cicatrisation normale. En effet, les fonctions leucocytaires sont modifiées par l'hyperglycémie (diminution de la phagocytose et du chimiotactisme) qui empêche la résolution de la phase inflammatoire. Le risque infectieux est dès lors accru. Par ailleurs, les modifications du système neurovégétatif rencontrées chez les diabétiques entraînent des dérivations (shunts) artérioloveinulaires entraînant une hypoxie cutanée secondaire par exclusion de certaines zones capillaires cutanées et d'un épaissement de la membrane basale des capillaires. Les atteintes sensitives entraînent pour leur part, des remaniements des zones d'appui au niveau de l'architecture des membres et notamment du pied. Ces différents facteurs exposent les patients diabétiques à des plaies chroniques extrêmement difficiles à cicatrifier, se compliquant souvent de phénomènes infectieux qui peuvent entraîner secondairement des amputations (mal perforant plantaire diabétique).

Il est donc très important de tester de nouvelles substances, de nouveaux pansements ou de nouveaux dispositifs médicaux sur des modèles de plaies chroniques représentatifs chez l'animal sain et diabétique qui pourront être utilisés chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la prise en charge des plaies cutanées chroniques.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de pansements en combinaison ou non avec l'administration d'un produit par voie orale agissant sur la glycémie sur un modèle de plaie cutanée chronique induit par ulcération ischémique chez la souris diabétique db/db. Dans ce but, après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, un suivi hebdomadaire de la glycémie et du poids des animaux sera effectué ainsi qu'un contrôle de l'insulinémie et un dosage de l'hémoglobine glyquée, avant l'induction de l'ulcération ischémique sur les 60 souris diabétiques db/db et les 10 souris témoins db/+ utilisées, permettant leur randomisation en groupes de traitement. Après induction de l'ulcération ischémique, les groupes seront traités avec les pansements à tester, avec et sans combinaison avec l'administration d'un produit agissant sur la glycémie.

Les animaux seront suivis quotidiennement, leur glycémie mesurée 1 fois par semaine et le pansement sera changé 3 fois par semaine, change au cours duquel les animaux seront pesés, la plaie cutanée sera observée et la surface de celle-ci sera déterminée. Les animaux seront euthanasiés à 2 temps différents, la moitié lorsque la

réduction de la taille de la plaie sera de 40% par rapport à la taille maximum, et l'autre moitié lorsque la réduction de la taille de la plaie sera de 80% par rapport à la taille maximum.

457- Les objectifs de l'étude sont d'étudier le rôle des récepteurs opioïdes sur les cellules gliales et sur les lymphocytes T dans le contrôle de la douleur chronique. La douleur chronique est un problème de santé majeur car un européen sur cinq souffre de douleur chronique quotidienne, qui nécessite un traitement. Cette douleur diminue la qualité de vie (dépression, anxiété, sommeil altéré) et entraîne d'importantes conséquences sociétales et économiques. Les analgésiques constituent la base des traitements en parallèle d'autres thérapies. Les opiacés et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont utilisés principalement pour réduire la douleur et l'inflammation mais sont efficaces pour une partie des patients seulement. Les analgésiques opiacés ciblent le récepteur opioïde mu, et les recherches montrent que le récepteur delta est une cible thérapeutique prometteuse. La douleur chronique et les opiacés activent, à côté des neurones, les cellules gliales astrocytes et microglies, et les lymphocytes T. Des approches pharmacologiques, qui ciblent les récepteurs sur ces cellules sont explorées pour limiter les effets secondaires des opiacés. Le but du présent projet est donc de comprendre le rôle des récepteurs opioïdes de ces cellules dans la douleur chronique et les effets des opiacés. Nous utiliserons des souris mutantes, génétiquement modifiées pour les récepteurs opioïdes afin de répondre à ces questions.

Avantages et dommages escomptés

Ce projet qui comprend le ciblage génétique des récepteurs opioïdes dans les types cellulaires d'intérêt, in vivo et dans l'animal entier, apportera de nouvelles connaissances sur les mécanismes de la douleur et permettra le développement de nouveaux médicaments basé sur ces découvertes. Le projet comprend des tests de perception de la douleur, puisque le but est le développement de nouveaux analgésiques.

Nombre et type d'animaux à utiliser

Les animaux seront des souris mutantes, knockout conditionnelles pour les récepteurs opioïdes mu ou delta dans les astrocytes, les microglies ou les lymphocytes T ainsi que les contrôles non knockout. Cinq lignées différentes, knockout du récepteur mu dans les astrocytes, de delta dans les astrocytes, de mu dans les microglies, de delta dans les microglies et de delta dans les lymphocytes T, seront générées. Comme, chez l'Homme, la douleur chronique est prévalente chez les femmes, nous étudierons à la fois les souris mâles et femelles, afin d'apprécier si le sexe constitue un facteur de régulation de ces phénomènes. Le nombre d'animaux à utiliser sera de 2300 au total, 400, 400, 500, 500 et 500 pour les années 1, 2, 3, 4 et 5, respectivement.

Exigence des 3 R

Remplacement : la douleur est un processus complexe dont l'étude nécessite un système intégré qui ne peut être étudié que dans un organisme entier. Les modèles animaux pour l'étude de la douleur et les effets d'analgésiques candidats ont été acceptés par l'Association Internationale pour l'étude de la Douleur (IASP) et sa branche française la SFETD :

<http://www.sfetd-douleur.org/viedelaSFETD/IASP/index.phtml>

Ces études comportementales sur l'animal seront complétées par des études in vitro, moléculaires et cellulaire, de l'activation des cellules gliales et de leurs caractéristiques.

Réduction et Raffinement

Les modèles de douleur ont déjà été mis au point et utilisent le nombre d'animaux au dessous duquel la validité des tests statistique ne pourrait plus être garantie.

458- Après une insémination, les poules ont la capacité de mettre en réserve les spermatozoïdes pour féconder les ovocytes plusieurs jours après. Ce phénomène de conservation des cellules gamétiques mâles est un objet d'étude particulièrement intéressant, notamment pour des applications terrain en reproduction mais aussi pour essayer de comprendre les mécanismes physiologiques mis en jeu. L'Unité de Recherches Avicoles a donc lancé depuis plusieurs années un travail de sélection de deux lignées divergentes sur la durée de Période Fertile, c'est à dire la durée pendant laquelle les spermatozoïdes de réserve restent capables de féconder des ovocytes. Ces deux lignées constituent des modèles importants pour l'étude de la reproduction. Faute de méthode de congélation des embryons, il est nécessaire pour les conserver, de faire reproduire les animaux et d'élever les descendants, en nombre aussi restreint que possible mais en conservant les animaux de chaque famille pour limiter la consanguinité. Le processus d'entretien des lignées divergentes implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles.

Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 260 jeunes pour 105 reproducteurs choisis dont 40 coqs et 70 poules, soit 740 adultes sur les 5 ans). Parmi l'ensemble des animaux nés, seuls les reproducteurs subiront la procédure expérimentale (prise de sang), à savoir 105 animaux par génération, soit 700 animaux sur les 5 ans. L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale pour l'entretien de ces deux lignées divergentes qui constituent un modèle animal unique pour étudier les mécanismes physiologiques de la reproduction chez le poulet.

459- Le niveau d'engraissement des poulets destinés à la consommation humaine est un caractère qui doit être maîtrisé car, lorsqu'il devient excessif, il engendre une appréciation négative par le consommateur et est aussi à l'origine d'une moins bonne efficacité alimentaire des animaux et de rejets en élevage plus importants. Disposer de lignées divergentes (sélectionnées dans des directions opposées) permet d'augmenter les différences entre animaux sélectionnés spécifiquement sur un caractère et d'être plus puissant pour rechercher les mécanismes physiologiques et les gènes en cause tout en limitant le nombre d'animaux utilisés, ici 40 mâles et 160 femelles adultes, soit 1340 animaux adultes sur les 5 ans. L'expérimentation porte sur le maintien de deux lignées divergentes pour l'état d'engraissement abdominal chez le poulet utilisées pour les études génétiques et physiologiques qui peuvent nécessiter des prélèvements sanguins. L'effectif de 600 animaux par génération (et 4000 pour les 5 ans) mis en place en début d'expérimentation par génération permet de garantir un effectif adulte minimum pour maintenir la variabilité intra et entre lignées en limitant la consanguinité et les risques de dérive génétique (c'est-à-dire la fixation due au hasard de gènes n'ayant pas de lien direct avec le caractère d'intérêt). La procédure expérimentale (une prise de sang) sera limitée aux reproducteurs, soit 1470 animaux sur les 5 ans du projet. L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale pour l'entretien de ces deux lignées divergentes qui constituent un modèle animal unique pour étudier les mécanismes physiologiques et rechercher les marqueurs moléculaires de l'adiposité abdominale chez le poulet.

460- Avec les évolutions des modes de consommation vers davantage de produits découpés et élaborés, la qualité technologique de la viande de volaille est devenue un enjeu majeur pour l'industrie avicole. Celle-ci dépend largement du pH ultime (pHu) qui, selon une enquête dans les abattoirs français, est encore mal maîtrisé. Deux défauts majeurs existent : les viandes à pHu bas ($\leq 5,7$), dites acides, qui se caractérisent par une couleur pâle, une texture dure après cuisson et une mauvaise aptitude à la transformation, et les viandes à pHu élevé ($\geq 6,2$), dites « DFD », plus sombres et tendres, sèches en bouche et plus sensibles aux problèmes de conservation. Afin de comprendre le déterminisme du pH ultime, deux lignées divergentes de poulets sont en cours de sélection à partir d'une souche commerciale de poulet standard. Le processus de sélection implique le choix d'animaux futurs reproducteurs sur la base de leur valeur génétique estimée à partir de la mesure du pH ultime chez des collatéraux.

A chaque génération sont choisis un total de 240 reproducteurs (à haute ou basse valeur génétique, selon la lignée) parmi un ensemble de 650 candidats. Cet effectif animal est nécessaire à la réalisation d'un progrès génétique tout en limitant la consanguinité au sein des lignées. La procédure expérimentale (une prise de sang) sera limitée aux reproducteurs, soit un total de 1600 animaux, sur les 5 ans du projet.

461- Avec les évolutions des modes de consommation vers davantage de produits découpés et élaborés, la qualité technologique de la viande de volaille est devenue un enjeu majeur pour l'industrie avicole. Celle-ci dépend largement du pH ultime (pHu) qui, selon une enquête dans les abattoirs français, est encore mal maîtrisé. Deux défauts majeurs existent : les viandes à pHu bas ($\leq 5,7$), dites acides, qui se caractérisent par une couleur pâle, une texture dure après cuisson et une mauvaise aptitude à la transformation, et les viandes à pHu élevé ($\geq 6,2$), dites « DFD », plus sombres et tendres, sèches en bouche et plus sensibles aux problèmes de conservation. Afin de comprendre le déterminisme du pH ultime, une expérience de sélection divergente est en cours à partir d'une souche commerciale de poulet standard. A chaque génération, 2 lots de 450 animaux sont élevés jusqu'à 6 semaines d'âge puis abattus pour mesurer des caractères de qualité de la viande et du métabolisme musculaire. Ces mesures permettront d'estimer les valeurs génétiques des collatéraux de ces animaux qui naissent et sont gardés comme futurs reproducteurs de la génération suivante. A chaque génération, l'effectif des animaux mis en place est optimisé pour garantir une bonne estimation des valeurs génétiques tout en limitant le nombre d'animaux mesurés, soit 900 animaux par génération et 5400 animaux sur 5 ans. Des prélèvements de sang sont également réalisés sur ces animaux vivants pour extraire de l'ADN ou

doser des métabolites. L'objectif de ce document est de valider l'élevage et l'abattage des animaux et la procédure expérimentale de prélèvement de sang sur ces animaux.

462- La production de poulet de chair en France et à l'étranger s'est orientée depuis plusieurs années vers la réduction de la durée d'élevage, afin de limiter les coûts de production. Pour répondre à cette problématique, les sélectionneurs avicoles ont sélectionné des animaux dans l'objectif d'améliorer la vitesse de croissance. Cette sélection a entraîné avec elle de nombreux changements métaboliques, physiologiques, squelettiques et comportementaux qu'il est important d'évaluer et d'étudier. Pour y répondre, l'INRA a créé il y a plusieurs années, deux lignées expérimentales modèles sélectionnées de manière divergente (sélectionnées dans des directions opposées) sur la vitesse de croissance, les X33 qui sont à croissance rapide et les X44 qui sont à croissance lente. Aujourd'hui, nous sommes à la 57ème génération de sélection de ces lignées (en entretien) qui servent dans plusieurs expérimentations, notamment dans la caractérisation des effets d'un gène de coloration de la viande. Le gène de coloration BCMO1 a d'ailleurs été mis en évidence à partir de ces lignées et fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Le processus de sélection des lignées divergentes implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 590 jeunes pour 202 reproducteurs choisis dont 50 coqs et 152 poules, soit 1350 adultes sur les 5 ans). Ces deux lignées divergentes sont donc des modèles animaux particulièrement pertinents pour l'étude des effets de ce gène de coloration et pour les études sur l'impact d'une sélection sur la vitesse de croissance. L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale de prises de sang des reproducteurs à chaque génération pour l'entretien de ces deux lignées divergentes qui constituent un modèle animal unique pour étudier les incidences physiologiques de l'augmentation de la vitesse de croissance

463- Depuis de nombreuses années, les salmonelles sont à l'origine de nombreuses infections alimentaires liées à la consommation de produits animaux contaminés. Parmi ces produits, la viande de volaille et les œufs sont les plus souvent responsables des contaminations humaines. Il est donc important de limiter la contamination des animaux, notamment par une amélioration des techniques d'élevage mais aussi, si possible, de la résistance génétique des animaux à ce pathogène. Identifier des zones du génome responsables de cette sensibilité permettra de sélectionner des animaux résistants génétiquement au portage de salmonelles.

Pour répondre à cet objectif, l'INRA entretient depuis 10 générations une lignée issue du croisement entre la lignée sensible 6 et la lignée résistante N. Cette lignée que nous appelons AIL6N constitue un modèle d'étude original et particulièrement efficace pour l'identification des régions chromosomiques impliquées et à terme des gènes de résistance.

Faute de méthode de congélation des embryons, il est nécessaire pour les conserver, de faire reproduire les animaux et d'élever les descendants, en nombre aussi restreint que possible mais en conservant les animaux de chaque famille pour limiter la consanguinité. De plus, le processus de sélection des lignées implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 150 jeunes pour 60 reproducteurs choisis dont 20 coqs et 40 poules, soit 525 adultes sur les 5 ans). L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale de prises de sang des reproducteurs de chaque génération pour l'entretien de cette lignée expérimentale qui constitue un modèle animal unique pour étudier les incidences physiologiques et rechercher des gènes responsables de la résistance au portage de salmonelles.

464- Depuis de nombreuses années, les salmonelles sont à l'origine de nombreuses infections alimentaires liées à la consommation de produits animaux contaminés. Parmi ces produits, la viande de volaille et les œufs sont les plus souvent responsables des contaminations humaines. Il est donc important de limiter la contamination des animaux, notamment par une amélioration des techniques d'élevage mais aussi, si possible, de la résistance génétique des animaux à ce pathogène. Identifier des zones du génome responsables de cette sensibilité permettra de sélectionner des animaux résistants génétiquement au portage de salmonelles.

Pour répondre à cet objectif, l'INRA entretient depuis plusieurs années trois lignées consanguines présentant des différences de résistance au portage de salmonelles : les lignées 6 (sensible au portage de salmonelles

durant le jeune âge des animaux), 15 et N (résistantes durant le jeune âge au portage de salmonelles) et qui servent de modèles d'étude pour ce caractère et d'autres (notamment la résistance à *Campylobacter*). Le processus d'entretien des lignées implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 450 jeunes pour 165 reproducteurs choisis dont 55 coqs et 110 poules, soit 1105 adultes sur les 5 ans). Parmi l'ensemble des animaux nés, seuls les reproducteurs subiront la procédure expérimentale (prise de sang), à savoir 165 animaux par génération, soit 1105 animaux sur les 5 ans. L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale pour l'entretien de ces trois lignées qui constituent un modèle animal unique pour étudier les mécanismes physiologiques de la résistance au portage de salmonelles chez le poulet.

465- Aujourd'hui, l'augmentation des prix des matières et les nouvelles directives européennes sur l'environnement deviennent des points majeurs à optimiser dans les filières de productions animales, en particulier les filières avicoles. Dans ce contexte, il devient essentiel d'optimiser l'alimentation des volailles pour mieux valoriser l'aliment et les nouvelles matières premières issues des sous-produits de l'alimentation humaine, tout en limitant les rejets des animaux afin de garantir la pérennité des filières de production. Dans cet objectif, l'INRA a créé depuis 15 générations de sélection deux lignées divergentes modèles, sélectionnées sur le caractère d'Energie Métabolisable, qui permet d'étudier l'efficacité digestive des animaux en ayant deux lignées opposées. La lignée haute s'appelle D+ et a été sélectionnée pour bien digérer un blé de mauvaise qualité (les effectifs adultes sont de 22 coqs et 44 poules), la lignée basse s'appelle D- et a été sélectionnée pour mal digérer un blé de mauvaise qualité (les effectifs adultes sont de 22 coqs et 44 femelles). Le processus de sélection des lignées divergentes implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 340 jeunes pour 132 reproducteurs choisis dont 44 coqs et 88 poules, soit 885 adultes sur les 5 ans). L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale de prises de sang des reproducteurs de chaque génération pour l'entretien de ces deux lignées divergentes qui constituent un modèle animal unique pour étudier les incidences physiologiques de la digestibilité du poulet.

466- Aujourd'hui, l'augmentation des prix des matières et les nouvelles directives européennes sur l'environnement deviennent des points majeurs à optimiser dans les filières de productions animales, en particulier les filières avicoles. Dans ce contexte, il devient essentiel d'optimiser l'alimentation des volailles pour mieux valoriser l'aliment et les nouvelles matières premières issues des sous-produits de l'alimentation humaine, tout en limitant les rejets des animaux afin de garantir la pérennité des filières de production. Dans cet objectif, l'INRA a créé depuis 15 générations de sélection deux lignées divergentes modèles, sélectionnées sur le caractère d'Energie Métabolisable, qui permet d'étudier l'efficacité digestive des animaux en ayant deux lignées opposées. La lignée haute s'appelle D+ et a été sélectionnée pour bien digérer un blé de mauvaise qualité, la lignée basse s'appelle D- et a été sélectionnée pour mal digérer un blé de mauvaise qualité. Pour trouver des régions chromosomiques ou des gènes responsables de ce caractère et influençant d'autres caractères, des modèles d'analyses nécessitent la production d'animaux issus de deux lignées extrêmes et garantissant une variabilité importante de la population pour les caractères étudiés. Pour répondre à cet objectif, l'INRA a créé depuis 6 générations une lignée issue du croisement des deux lignées divergentes sur l'énergie métabolisable. Les effectifs adultes de cette lignée est de 18 coqs et 60 poules. Le processus de sélection des lignées implique un choix d'animaux futurs reproducteurs (dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité) parmi la liste des candidats, sur la représentation des familles. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs (ici 200 jeunes pour 78 reproducteurs choisis dont 18 coqs et 60 poules, soit 525 adultes sur les 5 ans). L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale de prises de sang des reproducteurs de chaque génération pour l'entretien de cette lignée expérimentale qui constitue un modèle animal unique pour étudier les incidences physiologiques et rechercher des gènes responsables de la digestibilité du poulet.

467- Le présent projet aura pour objectif de répondre aux questions suivantes :

1- Le stress prénatal (SP) de l'embryon a-t-il des effets bénéfiques ou délétères sur les comportements adaptatifs des juvéniles ?

2- La nature du facteur de stress (naturel ou artificiel) appliqué à l'embryon modifie-t-elle ces effets du SP ?

3- Le stress maternel induit-il chez les embryons l'émergence de phénotypes similaires à ceux observés lors de l'application d'un facteur de stress directement sur l'embryon ? Le cas échéant, par quels mécanismes ?

Le présent projet visera à étudier les effets de stress prénatals sur le développement précoce des comportements et des capacités cognitives chez la poule domestique *Gallus gallus domesticus*.

Pour étudier l'impact de stress pendant la vie embryonnaire nous allons exposer les embryons d'oiseaux à l'audition de cris de détresse de congénères ou à un léger stress de froid (stress qui peut se produire lors de l'ouverture des incubateurs, en conditions d'élevage industriel). Le stress maternel sera engendré par une instabilité sociale (changements réguliers de partenaires) chez des poules adultes. Dans tous les cas, pour étudier les conséquences sur les jeunes, des tests comportementaux non invasifs (observation des animaux) seront utilisés. En se basant sur un ensemble de travaux antérieurs conduits au sein de notre unité nous estimons au total avoir besoin de 490 poussins et de 80 poules adultes pour répondre à ces questions. Sur l'ensemble, 90 poussins seront sacrifiés pour l'analyse des conséquences de tels stress sur le développement cérébral. Les animaux restants seront tous mis en vente en fin d'expérience par l'unité expérimentale. L'intérêt actuel des particuliers pour les poules pondeuses nous permettra de replacer l'intégralité des animaux (réhabilitation).

468- Les anévrismes aortiques (AA) favorisés par l'athérosclérose et l'hypertension artérielle (HTA) présentent le risque de rupture lorsque l'artère malade accroît son diamètre. D'où l'intérêt d'implanter par voie endovasculaire une endoprothèse pour réduire le flux dans l'anévrisme. Plusieurs endoprothèses ont été développées pour répondre à cet objectif. Dans certaines conditions, l'exclusion peut être réalisée par une endoprothèse bifurquée constituée de deux branches destinées aux artères iliaques (figure 1). La question fondamentale dans ce type de dispositif est de permettre après implantation du dispositif médical (DM) d'assurer l'exclusion de l'anévrisme, sans provoquer d'endofuite pouvant réduire à néant l'objectif principal.

Un nouveau dispositif est en développement. Il offre la particularité de traiter ce type de pathologie. Ce DM présente des améliorations importantes par rapport aux produits actuellement sur le marché. Son maillage performant entraîne une réduction et une modification du flux et la préservation des artères collatérales couvertes par l'endoprothèse. Cette nouvelle génération d'endoprothèse dite modulateur de flux multicouche (MFM) offre donc des avantages très importants par rapports aux dispositifs actuels. Ce projet a pour but d'étudier la sécurité et les performances de cette prothèse bifurquée sur un modèle porcin.

Les résultats de l'étude préclinique doivent permettre de démontrer la conformité aux exigences essentielles. Il sera ainsi vérifié, les performances et la sécurité du dispositif.

Cette phase animale qui étudiera ce DM dans un territoire anatomique approprié (aorte abdomino-iliaque) identique à l'homme complétera les informations recueillies en laboratoire.

Le choix de la race (lignée porc de taille réduite FBM) est en accord avec les caractéristiques de ce modèle proche de la pathologie anévrismale en ce qui concerne la susceptibilité de ce modèle à présenter une hypercholestérolémie et une HTA. Ce choix permet de réduire le nombre d'animaux, en étant au plus proche de la pathologie multifactorielle humaine. L'ensemble de l'étude sera mené sous GLP. Douze porcs seront implantés (une prothèse bifurquée/animal). Trois phases seront étudiées (court terme, moyen terme et long terme). Il sera tenu compte de la norme ISO 25539-2 :2012 sur les stents pour réaliser cette étude.

469- Notre équipe travaille sur un neuropeptide, la neurotensine, et ses récepteurs. Nous voulons comprendre son rôle physiologique chez les mammifères, afin de déterminer si ce système peut représenter une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du diabète. Nous avons montré, sur des modèles cellulaires, que la neurotensine module la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline est une fonction biologique cruciale, impliquée dans l'établissement de certaines pathologies comme le diabète. Nous voulons valider nos découvertes sur l'animal, grâce à des modèles murins transgéniques. Notre étude, sera réalisée sur des souris (fond génétique C57B6) qui n'expriment plus l'un ou l'autre récepteur de la neurotensine. Nous envisageons de réaliser sur les souris des expériences de physiologie classiques. Dans ce cas, les expériences envisagées sont des tests de tolérance au glucose, à l'insuline et des expériences sur organes isolés. Nous estimons que l'étude nécessite 301 animaux au total (souris C57B6 sauvages et transgéniques). L'objectif de cette étude est de montrer que la neurotensine peut représenter une piste thérapeutique pour le traitement du diabète de l'adulte

470- Des zones d'ombre subsistent quant aux voies par lesquelles notre organisme peut être exposé au contaminant perturbateur endocrinien le bisphénol A (BPA). Jusqu'à très récemment, on considérait que le BPA pénétrait l'organisme essentiellement par voie intestinale et subissait alors une dégradation quasi-totale dans le foie ce qui est incohérent avec les niveaux de concentration sanguine retrouvés dans différentes populations humaines. Des travaux récents indiquent qu'une voie transcutanée permettant d'échapper au premier passage hépatique est possible. L'objectif de ce projet est de démontrer qu'un tel processus conduit transitoirement à une exposition directe de tissus cibles par voie artérielle à des concentrations actives en BPA. Pour tester une telle hypothèse, il faut donc disposer d'un modèle in vivo (circulation sanguine intacte) permettant de réaliser simultanément des prélèvements sériés au niveau veineux et artériel.

L'expérience sera donc réalisée sur des moutons (*Ovis Aries*) dont la grande taille se prête à la réalisation de prélèvements sériés de façon peu invasive. Chaque animal étant son propre témoin, un nombre limité d'animaux est requis. Seulement 3 brebis seront incluses dans ce protocole.

471- La neurotensine est un peptide qui joue le rôle de neuromodulateur dans le système nerveux central et d'hormone dans la périphérie. Les actions du peptide sont médiées par 3 récepteurs identifiés à ce jour. Les récepteurs NTSRI et NTSR2 sont des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires (TM), le NTSR3, également nommé sortiline, est un récepteur de type 1 à une seule TM. Le NTSR3 joue également un rôle dans l'adressage d'autres protéines à la surface cellulaire et peut former des dimères avec le NTSRI ou le NTSR2. Des expériences préliminaires, réalisées sur des souris dont le gène codant pour le NTSR3 a été invalidé, démontrent une perte quasi totale du NTSR2 dans les souris KO-NTSR3. Ce dernier étant impliqué dans les effets analgésiques de la neurotensine, nous proposons de caractériser cette propriété dans les souris KO-NTSR3. De plus, des expériences préliminaires réalisées sur le KO-NTSR3 révèlent un phénotype de résistance à la dépression.

Les animaux utilisés seront répartis sur deux principales expériences qui sont: 1) des tests de douleur afin d'évaluer l'effet de la neurotensine sur les souris KO et des souris WT et 2) des tests de comportement afin d'évaluer les caractéristiques du phénotype de résistance à la dépression des souris KO et l'effet de la spidine sur ces souris.

Les doses testées seront réduites autant que possible et correspondront à la transposition des résultats obtenus dans la littérature.

L'espèce utilisée sera donc la souris et le nombre d'animaux prévu est de 500 pour trois ans.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en conservant un nombre d'individus suffisant pour avoir des statistiques fiables.

472- L'apoptose joue un rôle essentiel dans l'élimination des cellules cancéreuses accumulant des altérations génomiques (aberrations chromosomiques, mutations). Par ailleurs, la plupart des traitements anti-tumoraux provoquent la mort cellulaire, vraisemblablement par un processus apoptotique dépendant de l'activation des récepteurs de mort dont font partie Fas/CD95 et les récepteurs DR4/DR5. Dès lors, la restauration ou l'amplification de la signalisation apoptotique dans les cellules cancéreuses présente un intérêt majeur en cancérologie. CD95/Fas est un récepteur de mort appartenant à la famille du TNF-R (Tumor necrosis factor receptor). Il possède une région intracellulaire appelée Death Domain (DO), qui lors de la fixation du ligand CD95L, recrute la protéine adaptatrice Fas-associated Death Domain protein (FADD) qui à son tour, fixe les caspases 8 et 10. Le complexe multi-protéique ainsi formé, appelé DISC pour Death Inducing Signaling Complex, initie le signal de mort. Cette étape est souvent inhibée dans les cellules tumorales et les étapes qui précèdent la formation du DISC restent controversées. Nous avons montré que CD95L déclenchait une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) indépendante de la formation du DISC et du signal apoptotique, et impliquant une mobilisation des stocks calciques du réticulum endoplasmique IP3-dépendants et une entrée capacitative de calcium. Pour la première fois, nous avons montré que l'entrée capacitative de calcium exerçait un rétrocontrôle négatif sur la signalisation apoptotique des récepteurs de mort puisque l'inhibition des canaux CRAC (Calcium Release Activated Channel) par le BTP-2 ou le ML-9 induisait une augmentation de l'apoptose en réponse à CD95L dans des lignées tumorales d'origine hématopoïétiques. Cette découverte a des applications potentiellement importantes en cancérologie puisque nous avons observé que ce phénomène était généralisable aux thérapies anti-cancéreuses activant la voie des récepteurs de mort. C'est le cas en particulier du rituximab (RTX, anticorps anti-CD20) et des nouvelles générations d'AC anti-CD20, qui voient leur activité pro-apoptotique augmenter significativement en présence de BTP-2 et ML-9 dans les lignées

de lymphome diffus à grandes cellules B (lignée SUDHL4). De plus, nous avons montré que les canaux calciques de type CRAC étaient impliqués dans la prolifération des cellules lymphomateuses et que l'expression de ces canaux était altérée dans les tumeurs de patients atteints de lymphomes B non hodgkiniens. Notre objectif aujourd'hui est de valider l'efficacité d'une association RTX ou autres anti-CD20 avec le BTP-2 ou le ML-9 ou tout autre inhibiteur des canaux CRAC, in vivo chez le petit animal sur la croissance tumorale et de confirmer in vivo l'implication des canaux calciques CRAC dans l'oncogenèse des lymphomes B.

473- La spadine est un peptide de 17 acides aminés synthétisé à partir d'une séquence endogène provenant de la maturation post-traductionnelle du récepteur 3 de la neurotensine ou sortiline. La spadine est un bloqueur spécifique des canaux potassiques TREK-1. Ses propriétés antidépressives ont été démontrées sur différents modèles murins.

Ce peptide est libéré dans le sang et pourrait servir de marqueur biologique de la dépression ou de rémission de la pathologie, deux tests qui n'existent pas à l'heure actuelle. Des analogues de la spadine ayant pour but d'améliorer l'efficacité de la molécule sont en cours de développement. Après un premier criblage effectué par des techniques électrophysiologiques sur une lignée cellulaire qui exprime de façon stable le canal TREK-1, nous projetons d'étudier les propriétés de l'analogue le plus efficace dans des expériences in vivo.

Les animaux utilisés seront répartis sur trois principales expériences qui sont : 1) des prélèvements sanguins afin de mesurer le taux de spadine en fonction du cycle circadien et de la prise alimentaire, puis de l'âge et du sexe et 2) prélèvements de certaines régions du cerveau après injection de spadine ou d'analogue afin de quantifier l'expression des marqueurs de la neurogenèse et de la synaptogenèse, deux processus qui sont affectés au cours de la dépression et qui peuvent être restaurés par les antidépresseurs 3) étude de la signalisation neuronale induite par la spadine qui mène à la neurogenèse et à la synaptogenèse sur culture primaire de neurones. Les doses testées seront réduites autant que possible et correspondront à la transposition des résultats obtenus par électrophysiologie.

Le nombre d'animaux dépendra du nombre d'analogues, on peut estimer le nombre à environ 650 souris et 22 rats sur 5 ans toutes procédures confondues. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en conservant un nombre d'individus suffisant pour avoir des statistiques fiables.

474- De récents travaux ont révélé un rôle essentiel du cervelet dans l'élaboration de la représentation mentale de l'environnement, nécessaire à l'optimisation des performances de navigation. Il serait en effet impliqué dans l'intégration des indices idiothétiques (indices relatifs aux mouvements du corps), et par conséquent dans l'optimisation du trajet lors de la navigation. Nous approfondirons cette découverte en étudiant précisément les capacités de navigation de souris mutantes présentant des altérations fonctionnelles au niveau du cervelet et nous comparerons leurs performances à celles de souris dites sauvages (c'est-à-dire non mutantes). Nous prévoyons pour cette étude d'utiliser au maximum 30 animaux (*i.e.* 15 souris mutantes ; 15 souris sauvages) En parallèle, notre projet consistera à caractériser les relations anatomiques qui unissent le cervelet à ces différentes structures. Cette procédure expérimentale ne requerra pas plus de 32 animaux. Ainsi, pour notre projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum N= 62 animaux.

475- L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un trajet familier nous nous repérons aux objets présents autour de nous mais également aux mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de nous représenter notre corps dans l'espace tout en nous déplaçant. Cette carte mentale est formée grâce à l'action de nombreuses structures cérébrales interagissant entre elles et nous permettant ainsi de nous déplacer vers un but de manière optimale. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège se situe au niveau de l'hippocampe.

Nous cherchons maintenant à clarifier les mécanismes permettant au cervelet de participer à cette représentation mentale. Pour cela nous utilisons des souris transgéniques dont les plasticités synaptiques du cervelet ont été modifiées et analysons les conséquences sur la représentation mentale du corps dans l'espace et sur les capacités à se diriger directement vers un but. Nous utiliserons pour cela au maximum 40 souris.

476- L'analyse implantatoire ou/et le suivi longitudinal des patients ayant subi une intervention endovasculaire pour une pathologie anévrysmale requièrent des contrôles de leur endo-prothèse implanté. Différentes sources d'imagerie permettent de réaliser de tels actes. Depuis quelques années, les techniques modernes d'imagerie, comme le MDCT (multidetector computed tomography) et l'IRM (imagerie par résonance magnétique) sont les

techniques les plus couramment proposées pour permettre une analyse précise de la qualité de l'intervention. Pour ce faire les dispositifs implantés doivent satisfaire aux exigences sous RX ou radiofréquence. Aujourd'hui pour diverses raisons l'IRM est la technique la plus rationnelle d'autant que cette technique est non irradiante. Néanmoins la difficulté est liée aux artéfacts si le Dispositif Médical (DM) n'a pas été validé pour cette technique d'imagerie.

Depuis plusieurs années la société CARDIATIS travaille sur un concept nouveau d'endoprothèse multicouche dite MFM (Modulateur de Flux Multicouche) qui vient d'avoir l'autorisation de mise sur le marché aux USA et plus récemment en Europe.

Leur objectif aujourd'hui est de contrôler la visibilité d'un MFM sous séquence IRM. Pour ce faire cette société a été amenée à étudier divers matériaux à la fois biocompatibles et compatibles en IRM, pour satisfaire le patient opéré et l'interprétation de l'image acquise.

Une première phase a été menée in vitro et a permis de développer et acquérir sur banc d'essai des informations prometteuses pour justifier le passage à des essais précliniques (étude animale). Cette phase passe donc par une étape importante sur modèle animal pour valider les informations recueillies à ce jour en laboratoire.

Pour mémoire les études faites lors de la mise au point de ce DM l'ont été au Cr2i, et l'équipe chargée de mener l'étude animale, est parfaitement expérimentée à l'implantation d'endoprothèses aorto-abdominales.

Le choix de la race (lignée FBM) a été déterminé par notre connaissance du modèle et d'importantes similitudes avec l'homme. L'étude portera sur 3 périodes, court terme, moyen terme et long terme. A ces 3 périodes, 4 tailles de DM seront étudiées : diamètre maximum, minimum et intermédiaire. Trois porcs seront utilisés pour cette étude d'un poids moyen de 60kg (12 mois d'âge). Les tailles et le nombre d'implants par animal sont en lien direct avec les exigences européennes. Ces choix permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux pour cette étude.

477- Savoir se repérer dans l'espace pour identifier où l'on se trouve, vers où l'on va et surtout comment y aller est une activité essentielle et omniprésente de notre vie quotidienne. L'altération de cette fonction, telle que dans la maladie d'Alzheimer, a des conséquences désastreuses pour le patient et son entourage. En étudiant comment des souris explorent et apprennent leur espace, nous cherchons à identifier les structures cérébrales impliquées dans la construction de cartes mentales de notre environnement et dans leur utilisation pour choisir un chemin. Nous cherchons aussi à identifier leur organisation en réseaux fonctionnels durant les différents stades de l'apprentissage du chemin.

Notre modèle est l'apprentissage d'un chemin constitué de multiples virages par des souris dont nous analyserons trois stades: l'exploration de l'environnement dans lequel le chemin sera appris, l'acquisition du chemin, et la stabilisation de cette connaissance, stade se rapprochant d'une reproduction automatique du chemin. Nous utiliserons pour cela au maximum 110 souris.

Ces travaux seront à la base d'une collaboration avec une équipe de chercheurs en robotique qui aura pour but d'élucider le fonctionnement des zones cérébrales impliquées dans cet apprentissage. Le passage aux expérimentations de modélisation permettra de comprendre d'avantage sur le fonctionnement du cerveau en s'appuyant sur les données in vivo sans pour autant nécessiter d'avantage de souris.

La connaissance générée par ces travaux permettra de mieux appréhender les dérèglements pathologiques et de développer des outils de diagnostics et de thérapies comportementales.

478- Ce projet s'inscrit dans un programme gouvernemental de recherche et de développement de lutte contre le terrorisme nucléaire, radiologique, biologique et chimique (programme NRBC).

La ricine est une toxine de plante extrêmement toxique considérée comme une arme terroriste potentielle. Elle est classée dans la catégorie B des agents bioterroristes de dans la liste CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Il n'existe actuellement aucune contre-mesure médicale en cas d'intoxication par cette toxine. Cependant dans le cadre du projet NRBC, ont été développées des études visant à la caractérisation de molécules inhibitrices de la ricine (molécules chimiques ou biologiques) et une méthode de diagnostic d'intoxication à la ricine à l'aide de puce à ADN. Dans le cadre du projet NRBC, l'ANSM a développé un modèle in vivo d'intoxication à la ricine et a utilisé ce modèle pour la validation des molécules inhibitrices et également pour la mise au point de la méthode de diagnostic (Puce à ADN).

Dans ce contexte, le projet a pour objet de confirmer le potentiel diagnostique de la signature génique de l'intoxication à la ricine, dans un prélèvement sanguin de souris intoxiquées par la ricine.

479- Les vaccins sont des médicaments immunologiques qui font l'objet d'une libération de lots par les OMCL. Dans ce contexte l'OMCL doit s'assurer de l'activité biologique de chaque composant. Cette étude vise à mettre en place un test sérologique (recherche d'anticorps) pour la détermination simultanée de l'activité biologique de 2 composants (diphthérie, tétanos) d'un même type de vaccin. Ce test sérologique est une méthode alternative réalisée chez l'animal (bioessai), méthode décrite à la pharmacopée européenne. Résultats attendus : Mise en place de la méthode sérologique pour les 2 valences qui permettra de réduire le nombre d'animaux et de raffiner la méthode (absence de douleur). L'ensemble de cette étude nécessitera 720 cobayes de souche Dartley-Hunkin.

480- Le but final de ce projet est médical et concerne la surveillance de la grossesse. Il s'agit d'améliorer la prise en charge de la femme enceinte, afin de pouvoir prédire le plus précocement possible l'imminence d'un accouchement prématuré et d'administrer à temps aux futures mères un traitement qui prolongera le séjour des bébés dans l'utérus (prévention des menaces d'accouchement prématuré). Pour cela, nous devons dans un premier temps, évaluer la propagation de l'activité électrique (électromyogramme, EMG) de l'utérus et, dans un deuxième temps, nous servir de ces données pour valider un modèle physiologique de cette activité électrique de l'utérus, modèle développé au sein du laboratoire. Nous allons travailler sur 15 rates par an au maximum (Une étude statistique a permis de réduire ce nombre au strict minimum). Le premier objectif est de valider les outils de quantification de la propagation de l'EMG utérin au niveau de l'utérus, ce qui n'est pas possible chez la femme. L'expérimentation animale va donc nous permettre d'étudier la propagation de l'EMG utérin, moins complexe sur la rate que sur la femme, et de valider nos méthodes visant à quantifier cette propagation. Le deuxième objectif est de valider notre modèle physiologique. Pour cela nous avons besoin de quelques données physiologiques de propagation au niveau de l'organe (utérus), données qu'il n'est pas possible d'obtenir sur la femme enceinte, mais qui seront accessibles par l'expérimentation sur les rates. Il sera ensuite possible de travailler sur les signaux issus de notre modèle, une fois celui-ci validé, ce qui est conforme aux exigences de la règle 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer).

481- Deux critères de sélection différents ont été proposés pour améliorer l'efficacité 1 alimentaire:

- une sélection sur la consommation résiduelle (c'est-à-dire la quantité d'aliment ingéré corrigée pour les besoins d'entretien et de croissance) en régime alimentaire ad libitum,
- une sélection sur la vitesse de croissance en régime alimentaire rationné à 80%.

Dans le premier cas, le but est de sélectionner les animaux qui, pour une performance de croissance équivalente, consomment le moins d'aliment. Ce type de sélection a déjà été mis en œuvre chez les bovins, les ovins et les porcs; l'efficacité alimentaire est bien améliorée, la vitesse de croissance et la composition corporelle sont peu affectées.

Dans le second cas, parmi les animaux ingérant la même quantité d'aliment, le but est de sélectionner ceux qui ont la croissance la plus élevée. Afin de s'assurer que les animaux ingèrent bien l'intégralité de leur ration, le régime est rationné à 80%. Ce rationnement est régulièrement utilisé par les sélectionneurs de lapins, essentiellement pour réduire les risques de problèmes gastriques. Une sélection de ce type a récemment été réalisée chez le porc. Elle a permis de montrer que l'efficacité alimentaire était améliorée, avec une augmentation de la vitesse de croissance et une diminution de l'adiposité des carcasses.

Le but du projet est de comparer l'amélioration de l'efficacité alimentaire dans les deux lignées, à la fois en termes de performances de croissance, mais aussi de qualité de la viande et de quantité de rejets.

482- La recherche des bases neuronales de la conscience est un sujet d'intérêt des neurosciences pour comprendre comment le cerveau prend une décision adaptée au stress en vue de maintenir la vie. De cette décision résulte une conduite physiologique, en adéquation avec les facteurs externes en fonction de la plasticité neuronale. L'inadaptation des réactions au stress peut donc résulter d'une limite des ressources plastiques du cerveau. Pour tester notre hypothèse, nous centrons nos analyses moléculaires, cellulaires et comportementales sur l'étude des systèmes sérotoninergiques car de leur intégrité dépend la survie de l'organisme, y compris d'un phylum à l'autre. En effet, leur affection altère l'instinct de survie (dépression) attendant à la motivation (addiction) et à la conduite alimentaire (anorexie, boulimie). En particulier, nous étudions donc comment les variations d'activité des récepteurs de la sérotonine (5-HT1A, 5-HT1B), et surtout des récepteurs 5-HT4 en l'absence ou non de production de 5-HT dans le cerveau et de leur voies de signalisation in vivo altèrent la motivation jusqu'à provoquer une addiction aux drogues et un refus de manger en dépit du besoin quotidien en énergie i.e. l'anorexie. Pour cela, nous utilisons une approche pluridisciplinaire

incluant l'utilisation de souris transgéniques dont celles privées des R5-HT4 (generation V. COMPAN, Lab. R. HEN, U. COLUMBIA New-York) ou R5-HT1B (don par R. HEN, COLUMBIA New-York) ou de 5-HT centrale (generation L. GUTKNECHT, Lab. P. LESCH, ZEMM, Würzburg, Allemagne).

483- Le Vémurafénib est un inhibiteur de la protéine kinase BRAF (Kinase impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire et mutée dans 50% des mélanomes) utilisé avec succès dans le traitement des mélanomes mutés sur cette même kinase.

Toutefois, l'acquisition de résistance à ce traitement est un problème majeur dans la prise en charge des mélanomes.

Notre équipe a récemment mis en évidence un de ces mécanisme de résistance et identifiée deux drogues (FL3 et 4EG11) qui permettraient d'inhiber ce mécanisme de résistance et par la même occasion de sensibiliser de nouveau les cellules au Vémurafénib (Nos résultats obtenus in-vitro le démontre). Ces deux drogues ciblent la machinerie transcriptionnelle de la cellule. Pour des raisons de confidentialité je ne pourrais pas en détailler les mécanismes d'action ici.

Le but de notre étude est de confirmer in-vivo sur le modèle animal adéquat-(Souris nude) les résultats obtenus in-vitro sur un panel de lignées humaines de mélanome.

Pour cela, nous utiliserons 130 à 150 souris nude réparties sur 6 groupes que nous traiterons pendant trois semaines. L'implantation des xénogreffes se fera dans le flanc droit des souris. Les souris recevront soit du Vémurafénib, soit du Vémurafénib en combinaison avec l'une ou l'autre des deux drogues inhibitrices du mécanisme de résistance. Le Vémurafénib à une dose de 200mg/kg est contenu dans les croquettes servant à nourrir les souris, les deux autres drogues quant à elles sont administrées en injection intra-péritonéales une fois par jour.

Concernant l'administration de Vémurafénib, nous savons (Observations réalisées lors de précédentes études, par pesée quotidienne des croquettes) que chaque souris consomme en moyenne 4 à 5 grammes de croquettes par jours. Pour s'en assurer, nous effectuerons de la même manière, une pesée quotidienne des croquettes pendant l'étude.

La mesure du volume tumoral nous servira d'indicateur de l'efficacité de nos traitements. En effet, une mesure du volume tumoral, une pesée ainsi qu'une évaluation de l'état général des souris sera effectuée chaque 48h. A l'issue de l'étude les souris seront euthanasiées à l'aide d'une chambre à CO₂ et les tumeurs seront prélevées et conservées pour être analysées.

484- Le cancer cérébral et la maladie de Parkinson (MP) sont deux problèmes majeurs de santé publique caractérisés par un dérèglement de la mort cellulaire dans le cerveau. Ainsi le cancer est caractérisé par une exacerbation des processus de survie tandis que les maladies neurodégénératives sont associées à une mort neuronale augmentée. Des études épidémiologiques ont établi une corrélation négative entre le développement de MP et le risque de cancer ce qui suggère la possibilité de dénominateurs moléculaires communs. Plusieurs protéines responsables des formes génétiques de la MP régulent la prolifération et la mort cellulaire programmée, deux processus inversement dérégulés dans ces pathologies. Nous étudions au laboratoire le rôle de protéines responsables de formes génétiques de la MP dans l'origine de ces dérèglements présents dans ces deux pathologies. Cependant, si nos nombreux résultats obtenus par des approches de biologie cellulaire étaient préalablement nécessaires à l'identification des dysfonctionnements moléculaires intervenant dans la MP et dans le cancer cérébral, ceux-ci nécessitent une validation physiologique dans des modèles intégrés chez l'animal. Mon projet de recherche nécessite donc la mise en place de modèles animaux visant à mimer la maladie de Parkinson et le cancer cérébral chez la souris. Pour mimer la maladie de Parkinson nous nécessitons l'injection intracérébrale d'une toxine appelée 6-hydroxydopamine couplée ou non à une modulation contrôlée (sur production ou déplétion) des protéines d'intérêt par une approche d'injection virale directement dans le cerveau ou en périphérie. Enfin, pour mimer le développement tumoral chez la souris, nous avons besoin d'injecter des cellules cancéreuses surproduisant ou pas les protéines d'intérêt afin d'évaluer leur impact sur la genèse de tumeurs et parallèlement afin de tester leur potentiel curatif et/ou préventif, tester leur impact sur le développement de la tumeur en modulant leur niveaux avant et après l'installation de la tumeur dans le cerveau. Ce projet de 5 ans sera réalisé, dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), sur un total de 2132 souris maximum.

485- Babesia divergens est un Protozoaire Apicomplexe parasite obligatoire des hématies de ses hôtes, vectorisé par les tiques. Son hôte naturel est le bovin, chez lequel il est responsable de la babésiose bovine, mais il est

capable d'infecter certains Cervidés et le mouton. Il s'agit de surcroît d'une espèce zoonotique qui peut être mortelle chez l'homme, car souvent mal diagnostiquée. La Gerbille de Mongolie est l'hôte de laboratoire de cette espèce.

L'objectif du présent projet est de produire des antigènes de *Babesia divergens*, c'est à dire des hématies parasitées, chez la Gerbille de Mongolie. Ces antigènes sont utilisés pour le diagnostic sérologique de la babésiose par Immunofluorescence indirecte, chez les différents hôtes, y compris l'homme. L'utilisation d'autres sources d'antigènes, produits par culture in vitro du parasite, a été testée, mais les résultats sont malheureusement décevants, et le diagnostic difficile. Le parasite produit probablement uniquement in vivo des facteurs de virulence et des protéines de surface qui sont reconnus par les anticorps des hôtes à diagnostiquer. L'issue des infections expérimentales de gerbilles par *Babesia divergens* est fatale, la totalité du sang parasité étant collecté après euthanasie de l'animal. Dans la mesure du possible, nous utilisons des animaux considérés comme âgés par notre fournisseur, et qui seront euthanasiés s'ils ne sont pas vendus rapidement. Le nombre de Gerbilles utilisées dans ce projet s'élève à 4 par an environ, en fonction des demandes de diagnostic.

486- Les pathologies artérielles contribuent de façon majeure à la morbidité et la mortalité cardiovasculaires. Le but de notre programme de recherche est d'identifier les mécanismes responsables des pathologies vasculaires majeures et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les protéines G monomériques de la famille Rho (RhoA, Rac1...) sont des régulateurs essentiels de nombreuses fonctions des cellules musculaires lisses vasculaires. Bien que la reconnaissance des voies de signalisation dépendantes des petites protéines Rho comme cible pharmacologique pour le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies vasculaires soit aujourd'hui acquise, aucune cible moléculaire spécifique n'est aujourd'hui définie. La réalisation de nos projets a pour objectif d'identifier l'ensemble des fonctions assurées par les protéines Rho dans le système vasculaire et de connaître leurs implications dans l'hypertension et le remodelage vasculaire.

Le nombre total d'animaux est : 1280 souris et 220 rats. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisé, les animaux contrôles pourront servir à différentes procédures. Toutes les procédures seront également effectuées avec les analgésiques adéquates dès que nécessaire.

487- Vu l'augmentation massive du nombre de personnes atteintes de diabète de type II en France et dans le monde, nous voulons développer de nouvelles molécules antidiabétiques permettant de palier aux 10% d'échec thérapeutique de la metformine, antidiabétique mondialement prescrit, et comportant moins d'effets secondaires que les molécules retirées récemment du marché. 200 molécules ont été conçues par une personne expérimentée en leur prédisant le moins d'effets toxiques possibles avec la perspective d'obtenir entre deux et cinq molécules efficaces. Dans les premières expériences, l'animal nous servira à sélectionner des molécules sur la base de leur effet hypoglycémiant et de leur non toxicité aiguë et c'est la souris, avec sa petite taille, qui sera le rongeur le plus adapté au screening de ces molécules. Afin de s'assurer de l'efficacité des molécules sélectionnées et d'approfondir l'étude pharmacologique, nous prévoyons des expériences chez le rat. Les modèles de diabète de type 2 existants chez la souris et le rat seront utiles pour mettre en évidence les organes cibles et les mécanismes d'action des candidats-médicaments.

Une des cibles de nos molécules est la synthèse de glucose qui existe dans le foie et le rein de l'animal mais qui n'existe pas dans les lignées cellulaires. C'est pourquoi on ne peut remplacer l'animal dans notre projet.

Nous prévoyons d'utiliser sur 5 ans, environ 850 souris et 400 rats parmi lesquels différents modèles de diabète. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous organiserons les lots d'animaux de façon à minimiser la taille des groupes tout en tenant compte de la variabilité de chaque souche animale afin de pouvoir pratiquer un test statistique fiable. Les animaux participeront à plusieurs tests à condition qu'ils ne présentent pas de modification de leur état général et en respectant un temps de repos entre 2 expériences ; ceci réduit aussi le nombre d'animaux. Dans un souci de raffinement des méthodes, un temps d'acclimatation à l'expérimentateur est prévu de façon à réduire le stress animal et le gavage sera pratiqué sous un volume adapté à la taille de l'animal. Les glycémies seront mesurées sur quelques microlitres de sang prélevés à la veine latérale de la queue minimisant ainsi le risque de souffrance de l'animal. Dans les expériences nécessitant des prélèvements d'organes, les animaux seront systématiquement anesthésiés et un antalgique sera associé.

Nous établirons une grille de suivi des animaux avec la mesure de différents critères permettant d'évaluer les effets indésirables et potentiellement toxiques des molécules testées, comme par exemple un changement de poids, de comportement, d'apparence physique, etc. Si un ou plusieurs critère(s) évolue(nt) mal plusieurs jours

de suite, l'animal sera écarté de l'expérience afin de se rétablir. Si malgré l'arrêt du traitement il ne se rétablit pas et montre de plus en plus de signes de souffrance, il sera euthanasié. Si plusieurs effets irréversibles sont notés, entraînant à plus ou moins long terme la mort de l'animal, la molécule sera abandonnée dans la suite des expériences.

488- Notre projet est d'introduire un nouveau concept de navigation robotisée permettant le positionnement autonome d'une source de traitement au contact d'une tumeur focale, grâce à un système intégrant l'analyse de l'imagerie et/ou un système de repérage géométrique implanté dans l'organe à traiter. Notre objectif final est de parvenir à la preuve du concept d'une nouvelle génération de robot polyvalent à partir d'un robot préexistant capable de cibler de façon autonome une cible avec une précision de l'ordre du millimètre lorsque cette cible est en mouvement (mouvements naturels de la respiration). L'instrument conçu aura un impact fort tant sur le plan thérapeutique qu'économique. La précision apportée par ce type d'outil devrait permettre de traiter en toute sécurité, avec une exposition radiologique minimale, les tumeurs de petite taille et d'accéder à des traitements focaux avec une grande efficacité.

Le champ d'application est donc large puisque ce principe de traitement s'applique à la plupart des tumeurs solides dès lors que leur identification radiologique et leur accès chirurgical ou percutané sont possibles. L'impact sur le plan médical est important car le robot permettra d'associer aux principes des traitements focaux la possibilité d'un accès précis à la tumeur (de l'ordre du mn) et le contrôle permanent du thérapeute: radiologue avec l'échographie ou chirurgien avec la navigation visuelle.

Des expérimentations préalables ont été réalisées et ont permis l'affinage de l'outil et de ses paramètres de contrôle. La validation des données recueillies est maintenant nécessaire sur le modèle vivant. La finalisation du projet prévoit donc la mise en route d'expérimentations portant sur des porcs fermiers d'environ 3 mois. Le nombre d'animaux préconisé pour ce projet est de 15, sachant que les expérimentations porteront sur les 2 reins pour chaque animal afin de réduire le nombre d'animaux (30 étaient initialement prévus dans le projet). Le porc a été choisi pour mener cette campagne d'expérimentation car il s'agit du modèle animal utilisé pour la chirurgie humaine et il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle de remplacement pour ce type de recherche et développement. Les animaux placés sur un tapis chauffant seront prémédiqués puis sous anesthésie générale (médicamenteuse) supplémentée avec un antalgique. Le suivi du « bien être » de chaque animal sera assuré par du personnel spécifique qualifié.

489- Ce projet présente les différentes opérations réalisées pour renouveler et entretenir les lignées de cailles STI, CTI, LTI, HSR, CSR et LSR. Ils concernent 1200 cailleteaux par génération, soit 200 animaux par lignée. Ces lignées existent depuis plus de 50 générations. Elles ne sont plus actuellement soumises à un processus de sélection, mais leur divergence leur confère un exceptionnel intérêt scientifique. Elles sont la base de nombreuses collaborations nationales et internationales. Les tests utilisés initialement pour la sélection sont présentés en annexe en fin de document, ils ne sont plus utilisés sur ces lignées qui sont entretenues sans sélection actuellement.

L'espèce de caille utilisée est d'origine japonaise (*Coturnix japonica*). La sélection a débuté en 1984 avec le croisement d'une lignée viande et d'une lignée pondeuse.

Six lignées de cailles (*Coturnix japonica*) sont présentes au sein du Pôle d'Expérimentation Avicole: les lignées STI (short tonic immobility) et LTI (long tonic immobility), sélectionnées de façon divergente sur un index de peur (durée d'immobilité tonique), les lignées HSR (high social reinstatement) et LSR (low social reinstatement), sélectionnées de façon divergente sur un index de sociabilité (test de motivation à rejoindre des congénères) et les deux lignées témoins correspondantes menées en parallèle CTI (control tonic immobility) et CSR (control social reinstatement). Ces six lignées constituent un matériel biologique unique pour étudier les facteurs génétiques et épigénétiques influençant la réactivité émotionnelle et les interactions sociales chez les oiseaux d'élevage. Dans ce type d'étude, la comparaison de lignées divergentes s'avère être un outil puissant pour repérer les mécanismes spécifiques du comportement étudié. Plusieurs approches complémentaires (éthologie, endocrinologie, neurobiologie, génétique) sont mises en œuvre sur ces cailles pour élucider les mécanismes contrôlant la réactivité émotionnelle et les interactions sociales. Ces études visent notamment à fournir des données scientifiques permettant d'objectiver le bien-être animal et de déterminer l'impact du caractère peureux ou social de l'oiseau sur ses autres comportements.

490- La coupe de queue des ovins est une pratique destinée à (i) diminuer les souillures de l'arrière-train par les fèces et mictions, et par conséquent les myases et (ii) faciliter les manœuvres et éviter les complications obstétricales.

Elle est pratiquée le plus souvent sur des agneaux de moins de 15 jours d'âge et selon 3 grands types de procédure : chirurgicale, par cautérisation ou par striction (élastique le plus souvent). Elle concerne essentiellement les futurs reproducteurs, et surtout les agnelles pour des raisons hygiéniques et de surveillance de la mise-bas. Les données de la littérature indiquent que toutes les méthodes employées sont sources de douleurs aiguës et chroniques même si elles n'entraînent pas de mortalité. La striction à l'élastique paraît entraîner le plus de douleur et c'est la méthode la plus utilisée par les éleveurs actuellement.

L'objectif de cette étude est donc de mettre au point une méthode de caudectomie moins douloureuse pour l'animal et ergonomique pour l'éleveur. La première partie de l'étude sera consacrée à la mise au point de l'appareil sur des animaux sous anesthésie générale (15 agneaux maximum). Les suites opératoires seront évaluées pour améliorer l'efficacité de l'appareil et aboutir à une version optimisée qui servira alors à réaliser la deuxième partie de l'étude. Lors de cette 2e partie, nous allons comparer l'effet du traitement "caudectomie classique par striction versus caudectomie par cautérisation" sur deux lots de 30 animaux.

Pour réaliser cette étude délicate d'évaluation de la douleur, nous utiliserons différents indicateurs en réalisant des mesures physiologiques (température, dosages), des mesures lésionnelles (observations de la plaie), des mesures zootechniques (pesées) ainsi que des mesures comportementales (budget-temps).

491- Les glucocorticoïdes (GC) et leurs analogues synthétiques font partie des médicaments les plus prescrits de par leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Cependant leurs effets secondaires métaboliques demeurent l'un des éléments limitant de leur utilisation à long terme, puisqu'ils peuvent entraîner le développement d'une intolérance au glucose, d'un diabète ainsi qu'une prise de poids associé à une lipodystrophie (obésité viscérale). Au niveau du tissu adipeux, les GC exercent des effets pléiotropes sur la biologie de l'adipocyte, régulant, in vitro, le métabolisme de l'adipocyte mature ainsi que le processus de différenciation des tissus adipeux.

Ce projet vise à déterminer, in vivo, les effets des GC sur les processus de différenciation des tissus adipeux, et sur la fonction sécrétrice de ces tissus, qui jouent un rôle prédominant dans le contrôle de l'homéostasie glucido-lipidique.

Ainsi nous utiliserons un modèle murin inductible d'inactivation du récepteur des GC spécifiquement dans le tissu adipeux. L'inactivation d'un gène chez la souris est un modèle utilisé en routine pour déterminer le rôle d'un gène dans la physiologie de l'animal. Grâce à ce modèle murin, nous explorerons, in vivo, les conséquences de l'inactivation du récepteur des GC sur le métabolisme glucido-lipidique. Nous analyserons les mécanismes à l'origine de ces désordres métaboliques. L'étude de ces modifications mettra en évidence de nouvelles pistes physiopathologiques afin de palier les effets secondaires chez les patients traités par des GC ou atteints de syndrome de Cushing (caractérisé par une élévation des GC endogènes).

L'ensemble de ces manipulations in vivo impliquera l'utilisation de 312 animaux pour une durée de 5 ans. Le nombre inclut le modèle murin d'inactivation du récepteur des GC spécifiquement dans le tissu adipeux ainsi que les lignées murines contrôles. Au cours de la mise en place de ce projet, nous avons tenu compte de la règle des 3R, en réduisant le nombre d'animaux par expérience (tout en conservant des valeurs statistiques) et en raffinant les procédures (limitant les « interventions » chez l'animal). Enfin, la pierre angulaire de ce projet est l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur des GC, il ne nous est pas possible de remplacer ces animaux.

492- La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la plus fréquente des rhumatismes inflammatoires chroniques, affectant plus de 50 millions de personnes dans le monde. Elle est considérée comme une maladie d'origine auto-immune, multifactorielle, de cause inconnue. Elle est caractérisée par l'infiltration massive des articulations par les cellules immunitaires qui entraînent de façon progressive douleurs, destructions articulaires et handicap, aboutissant en quelques années à une invalidité aux conséquences socioéconomiques lourdes. Depuis 20 ans des progrès formidables ont été effectués dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la PR mis en jeu, ce qui a conduit au développement de nombreuses biothérapies, dont 4 types sont maintenant utilisés en clinique. Il reste cependant 30% de patients non répondeurs, pour qui il est important de trouver des alternatives thérapeutiques. Le présent projet a pour objectif de développer des thérapies innovantes à partir des connaissances fondamentales récentes acquises sur les mécanismes

physiopathologiques de l'arthrite, et plus particulièrement sur le rôle des cellules de l'immunité innée dans l'arthrite au travers de l'étude des micro (mi) ARNs dans les monocytes inflammatoires.

Plusieurs modèles d'induction de l'arthrite existent chez la souris et, parmi eux, le modèle de l'arthrite induite chez la souris par immunisation avec le collagène. Nous travaillons depuis 15 ans sur la PR et utilisons en routine le modèle murin d'arthrite induite au collagène (CIA pour Collagen-induced arthritis), soit dans le fond DBA/1, soit dans le fond B6 afin d'étudier la susceptibilité à l'arthrite de diverses souches de souris déficientes (KO) pour les gènes d'intérêt. Ce modèle permet de reproduire la majorité des caractéristiques biologiques et cliniques observées dans la pathologie humaine dans l'objectif de développer des thérapies innovantes à partir des connaissances fondamentales acquises sur les mécanismes physiopathologiques de l'arthrite. La CIA est un modèle expérimental long (6-8 semaines à partir de l'immunisation) qui nécessite une observation régulière des animaux pour suivre les signes cliniques de la pathologie, ce qui permet également de détecter tout signe de souffrance.

Nos objectifs sont:

- (1) élucider le rôle joué par une population spécifique de cellules de l'immunité innée, les monocytes dits "classiques", dans les mécanismes d'inflammation et de destruction osseuse de l'arthrite,
 - (2) identifier des gènes clés régulant leurs actions pathogènes,
 - (3) développer une stratégie thérapeutique innovante visant à enrayer l'inflammation et l'érosion osseuse, en utilisant un vecteur lipidique (DMAPAP/DOPE) que nous avons développé et qui permet, suite à une injection intraveineuse, d'amener préférentiellement un ARN interférent dans les monocytes classiques.
- Au total nous utiliserons 200 souris pour chaque miRNA.

493- L'induction de colite chez la souris représente un bon modèle d'étude de maladies inflammatoires intestinales chroniques de l'intestin chez l'Homme. Ce type de pathologies concerne des patients de plus en plus jeunes et est en constante progression, telle que la maladie de Crohn (qui affecte 120000 personnes en France) ou encore la rectocolite hémorragique.

Ce projet pédagogique concerne les étudiants de la licence professionnelle intitulée « études moléculaires, cellulaires et intégrées des moléculaires bioactives ». Cet enseignement va permettre l'exploration et l'évaluation, à des fins pédagogiques, de l'état inflammatoire intestinal par des analyses histologiques et moléculaires, avec notamment le dosage de cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL1 β) et de l'activité de la myéloperoxydase au niveau du tissu colique, reflétant ainsi la réponse de l'organisme sur le site inflammatoire. Des souris Balb/C mâles, âgées de 6 à 8 semaines, sont utilisées pour cette induction.

L'induction de l'inflammation colique sera réalisée par administration orale dans l'eau de boisson de DSS (Dextran Sulfate Sodium) à deux concentrations différentes pendant 10 jours.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les étudiants (au nombre de 20) sont regroupés en binôme. Chaque binôme d'étudiants suivra un lot de 3 souris : 1 témoin et 2 traitées respectivement à 1 et 2% de DSS. Le nombre d'animaux est réduit au maximum: une souris témoin (référence pour comparaison pédagogique) et 2 souris traitées avec deux concentrations de DSS (recherche de l'effet dose dans l'action du produit DSS) par binôme avec 10 animaux par lot pour études statistiques.

Ce projet nécessite donc au total 30 souris par année d'enseignement.

La finalité de ce projet est la réalisation d'une étude exploratoire pluridisciplinaire de l'inflammation à but pédagogique, permettant aux étudiants de mieux appréhender les relations structurel fonction in vivo au sein de l'organisme d'un cas d'agression induite ici l'inflammation colique. Il n'existe pas de méthode alternative permettant de prendre en compte ce type d'interactions

494- La vaccination repose sur la mise en place d'une mémoire immunitaire par le système immunitaire adaptatif, i.e. lymphocytes T et B. Cependant, l'activité de ces 2 types cellulaires est hautement dépendante de signaux envoyés par les cellules du système immunitaire inné. Les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné dont le rôle direct dans l'élimination de cellules infectées ou tumorales est maintenant bien connu. Plusieurs travaux suggèrent que les cellules NK pourraient également moduler l'activité des cellules T et B. Ainsi, le présent projet a pour but d'étudier le rôle des cellules NK et l'importance relative de leurs fonctions effectrices (cytotoxicité, sécrétion de cytokines) dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative ainsi que leur impact dans l'efficacité de réponses vaccinales. Les expérimentations liées à ce projet seront menées sur la souris. En effet, ce modèle animal est le seul à l'heure actuelle permettant d'étudier une réponse immunitaire dans sa globalité étant donné les nombreuses interactions cellulaires et moléculaires nécessaires à

sa mise en œuvre. Ce projet s'attachera à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés mais permettant de maintenir la robustesse statistique nécessaire à la production de résultats fiables et concluants.

495- Les cellules Natural Killers (NK) sont des lymphocytes cytolytiques du système immunitaire inné qui peuvent tuer diverses cellules cibles comme des cellules tumorales, des cellules infectées par des microbes ou des cellules ayant subi un stress physique ou chimique. Une des caractéristiques majeures des cellules NK réside dans leur capacité à discriminer les cellules stressées des cellules dites normales ou saines. Leur système de détection repose sur une variété de récepteurs activateurs et inhibiteurs dont l'engagement régule l'activation. Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK interagissent avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) qui sont constitutivement exprimé par les tissus sains ce qui assure la tolérance des cellules des NK face au soi. Au cours d'un stress, les molécules du CMH-I peuvent être diminuées ce qui entraîne la toxicité des cellules NK. Les cellules NK expriment aussi divers récepteurs activateurs comme NKp46, NKp30, NKp44, les Killer cell immunoglobuline-like receptors (KIR) activateurs (KIR-S), NKG2D et CD16 qui fournissent des signaux positifs et entraînent la toxicité et la production d'IFN-g par les cellules NK. Bien que les ligands de certains de ces récepteurs restent encore à identifier, la découverte des ligands du récepteur NKG2D (familles MICA et RAET1) et de NKp30 (B7-H6) suggère que ces récepteurs reconnaissent des molécules qui sont présentes à de faibles niveaux à la surface des cellules normales et dont l'expression est augmentée au cours d'une infection ou d'un stress. Ainsi, en situation normale, les ligands activateurs sont rares à la surface des cellules saines et les ligands des récepteurs inhibiteurs sont présents. La balance des signaux fournis par les récepteurs inhibiteurs et activateurs prévient l'activation des cellules NK. En situation pathologique, la diminution des molécules du CMH-I et/ou l'augmentation du niveau d'expression des ligands activateurs déséquilibre cette balance ce qui entraîne l'activation des cellules NK. L'expression des activités fonctionnelles dépend donc d'une intégration quantitative des signaux positifs et négatifs délivrés par les cellules cancéreuses ou infectées. L'activation des cellules NK est régit par un équilibre dynamique et dépend de leur environnement. Nous avons récemment identifié un nouveau model murin appelé Noé dans lequel les cellules NK présentent un seuil d'activation plus bas que celui des cellules NK de souris sauvages à la suite d'une stimulation par leurs récepteurs activateurs ou d'une stimulation par des cytokines. Les cellules NK de la souris Noé sont aussi moins sensibles à des inhibiteurs de la transduction du signal que des cellules NK sauvages. De plus, les cellules NK de la souris Noé expriment un répertoire normal de récepteurs inhibiteurs et nous n'avons pas observé d'autoimmunité chez ces souris. Les souris Noé sont déficientes pour l'expression du récepteur activateur NKp46 dont l'engagement au cours de l'éducation des cellules NK calibre leur réactivité fonctionnelle. Nous avons réussi à mimer cette hyper-réactivité chez des souris sauvages ex vivo à la suite d'un traitement par un anticorps monoclonal anti-NKp46 qui bloque l'interaction du récepteur avec son ligand endogène. L'utilisation d'un anticorps anti-NKp46 pourrait avoir un intérêt thérapeutique chez des patients immunodéprimés, comme par exemple des patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétique. Par conséquent, nous souhaitons maintenant analyser in vivo l'activité antivirale des cellules NK des souris traitées par l'anticorps anti-NKp46.

Les expérimentations liées à ce projet seront menées sur la souris. En effet, ce modèle animal est le seul à l'heure actuelle permettant d'étudier une réponse immunitaire dans sa globalité étant donné les nombreuses interactions cellulaires et moléculaires nécessaires à sa mise en œuvre. Ce projet s'attachera à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés mais permettant de maintenir la robustesse statistique nécessaire à la production de résultats fiables et concluants.

496- Les cellules Natural Killers (NK) sont des lymphocytes cytolytiques du système immunitaire inné qui peuvent tuer diverses cellules cibles comme des cellules tumorales, des cellules infectées par des microbes ou des cellules ayant subi un stress physique ou chimique. Une des caractéristiques majeures des cellules NK réside dans leur capacité à discriminer les cellules stressées des cellules dites normales ou saines. Leur système de détection repose sur une variété de récepteurs activateurs et inhibiteurs dont l'engagement régule l'activation. Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK interagissent avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) qui sont constitutivement exprimé par les tissus sains ce qui assure la tolérance des cellules des NK face au soi. Au cours d'un stress, les molécules du CMH-I peuvent être diminuées ce qui entraîne la toxicité des cellules NK. Les cellules NK expriment aussi divers récepteurs activateurs comme NKp46, NKp30, NKp44, les Killer cell immunoglobuline-like receptors (KIR) activateurs (KIR-S), NKG2D et CD16 qui fournissent des signaux positifs et entraînent la toxicité et la production d'IFN-g par les cellules NK. Bien que les ligands de certains de ces récepteurs restent encore à identifier, la découverte des ligands du récepteur

NKG2D (familles MICA et RAET1) et de NKp30 (B7-H6) suggère que ces récepteurs reconnaissent des molécules qui sont présentes à de faibles niveaux à la surface des cellules normales et dont l'expression est augmentée au cours d'une infection ou d'un stress. Ainsi, en situation normale, les ligands activateurs sont rares à la surface des cellules saines et les ligands des récepteurs inhibiteurs sont présents. La balance des signaux fournis par les récepteurs inhibiteurs et activateurs prévient l'activation des cellules NK. En situation pathologique, la diminution des molécules du CMH-I et/ou l'augmentation du niveau d'expression des ligands activateurs déséquilibre cette balance ce qui entraîne l'activation des cellules NK. L'expression des activités fonctionnelles dépend donc d'une intégration quantitative des signaux positifs et négatifs délivrés par les cellules cancéreuses ou infectées. L'activation des cellules NK est régit par un équilibre dynamique et dépend de leur environnement. Nous avons récemment identifié un nouveau model murin appelé Noé dans lequel les cellules NK présentent un seuil d'activation plus bas que celui des cellules NK de souris sauvages à la suite d'une stimulation par leurs récepteurs activateurs ou d'une stimulation par des cytokines. Les cellules NK de la souris Noé sont aussi moins sensibles à des inhibiteurs de la transduction du signal que des cellules NK sauvages. De plus, les cellules NK de la souris Noé expriment un répertoire normal de récepteurs inhibiteurs et nous n'avons pas observé d'autoimmunité chez ces souris. Les souris Noé sont déficientes pour l'expression du récepteur activateur NKp46 dont l'engagement au cours de l'éducation des cellules NK calibre leur réactivité fonctionnelle. Nous avons réussi à mimer cette hyper-réactivité chez des souris sauvages ex vivo à la suite d'un traitement par un anticorps monoclonal anti-NKp46 qui bloque l'interaction du récepteur avec son ligand endogène. L'utilisation d'un anticorps anti-NKp46 pourrait avoir un intérêt thérapeutique chez des patients immunodéprimés, comme par exemple des patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétique. Par conséquent, nous souhaitons maintenant analyser in vivo l'activité antivirale des cellules NK des souris traitées par l'anticorps anti-NKp46.

Les expérimentations liées à ce projet seront menées sur la souris. En effet, ce modèle animal est le seul à l'heure actuelle permettant d'étudier une réponse immunitaire dans sa globalité étant donné les nombreuses interactions cellulaires et moléculaires nécessaires à sa mise en œuvre. Ce projet s'attachera à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés mais permettant de maintenir la robustesse statistique nécessaire à la production de résultats fiables et concluants. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 110 souris de souche C57BL/6 J.

497- Le projet s'inscrit dans le cadre d'une formation de la licence de Psychologie ayant pour objectif l'acquisition de compétences expérimentales dans différents domaines de la psychologie. Cette formation, le Travail d'Etude et de Recherche, comprend plusieurs Unités d'Enseignement (UE) optionnelles consistant en des travaux pratiques parmi lesquelles une UE intitulée « Psychologie expérimentale animale » et qui constitue l'objet de la présente demande d'autorisation.

Dans ce cadre de cette formation, les étudiants (par groupes de 2-3) sont confrontés, concrètement, aux différentes étapes d'une expérimentation en psychologie expérimentale animale ; recherche bibliographique et élaboration d'une hypothèse opérationnelle, élaboration du plan expérimental, réalisation de l'expérience, analyse des résultats, et communication (rédaction d'un mini-mémoire de stage sous la forme d'un article scientifique et élaboration d'un poster scientifique). Les tâches comportementales proposées sont des tâches traditionnelles en psychologie expérimentale animale et permettant d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire des animaux en articulation avec les enseignements magistraux en psychobiologie de la licence de Psychologie : localisation de lieu en piscine de Morris et reconnaissance d'objet. Ces tâches ne nécessitent ni restriction (alimentaire ou hydrique), ni administration de stimuli aversifs (choc électrique par exemple). Chaque expérience utilise soit un groupe d'animaux lorsqu'une comparaison intra-groupe permet de tester l'hypothèse (par exemple influence du délai entre phase d'échantillonnage et phase de test en reconnaissance d'objets), soit deux groupes d'animaux lorsque l'hypothèse requiert une comparaison inter-groupes (par exemple influence de la présence d'indices visuels proximaux sur l'apprentissage de localisation d'un lieu). Le nombre d'animaux par groupe (n=10) est suffisant pour permettre une analyse statistique des résultats obtenus compte-tenu de la variabilité des performances des animaux dans les tâches proposées. Le nombre total d'animaux qui sera utilisé dans le projet est de 300 (60 par an ; 5 ans).

Les animaux utilisés sont des rats mâles adultes Long-Evans, achetés auprès d'un fournisseur et familiarisés à la manipulation par des personnes compétentes avant le début du projet. Les différentes expériences se déroulent sur deux ou trois semaines entre les mois de février et de mars, permettant la réutilisation des mêmes animaux dans le cadre d'un autre projet pour lequel une demande d'autorisation est déposée simultanément à la

présente demande (demande intitulée Evaluation de l'apprentissage et de la mémoire chez le Rat de laboratoire).

498- Le projet s'inscrit dans le cadre d'une Unité d'Enseignement (UE) de la première année du Master de Neurosciences de l'Université de Strasbourg (intitulé: « Ateliers techniques en neurosciences») et ayant pour objectif de donner aux étudiants une formation pratique aux principales techniques utilisées pour la recherche en neurosciences. Cette UE (40 étudiants au maximum par année universitaire) comprend en particulier des travaux pratiques en comportement animal, organisés les après-midis de deux semaines bloquées dans l'emploi du temps, ces travaux pratiques faisant l'objet de la présente demande d'autorisation de projet.

Ces travaux pratiques sont organisés sous la forme d'ateliers dans lesquels ils apprennent à manipuler leurs animaux (quatre animaux par groupe d'étudiant; 8 groupes d'étudiant) puis effectuent la passation des tests comportementaux. Ces tests, classiques dans le domaine des neurosciences, permettent d'illustrer différents champs d'investigation en recherche. Ainsi, les tests proposés permettent l'évaluation des capacités sensori-motrices et cognitives ainsi que de la réactivité émotionnelle des animaux. Aucun de ces tests ne nécessite de limiter le bien-être des animaux (pas de restriction alimentaire ou hydrique) ou de les exposer à des stimuli douloureux. Les animaux utilisés (36 par formation) sont des rats réutilisés d'un projet antérieur pour lequel une demande d'autorisation est déposée simultanément à la présente demande (demande intitulée Comportement du rat de laboratoire).

499- Le projet s'inscrit dans le cadre d'une formation du Master 1 de Pharmacologie dont les enseignements ont pour objectif de donner aux étudiants une formation théorique et pratique dans le domaine de l'expérimentation animale et en particulier de celle incluant des procédures comportementales. Les principes des principales tâches comportementales utilisées pour évaluer les fonctions sensorimotrices, la réactivité émotionnelle, l'impulsivité, les processus attentionnels et mnémoniques sont abordées du point de vue théorique.

Au niveau pratique, les étudiants sont formés à l'élaboration d'un plan expérimental (neutralisation/contrôle des différents facteurs, nombre de groupes ou de conditions, effectifs requis en fonction de la finalité de l'expérience, etc...) et réalisent eux-mêmes, en petit groupe (4-5), un test comportemental pendant une semaine bloquée dans leur emploi du temps, au mois de mars. De fait, la formation concernant une vingtaine d'étudiants, quatre tâches doivent pouvoir être proposés simultanément.

Celles-ci ciblent les fonctions mnésiques et sont choisies parmi des tâches traditionnelles en laboratoire à l'exception de celles nécessitant l'utilisation d'un stimulus nociceptif ; tâches de reconnaissance, de mémoire spatiale (en piscine de Morris et en labyrinthe radial) et d'alternance spontanée en labyrinthe en T. Le nombre d'animaux utilisés pour chacune de ces tâches (n = 10 pour la tâche de reconnaissance et de mémoire spatiale en labyrinthe radial , n = 20 pour les deux autres tâches) est suffisant pour permettre une analyse statistique des résultats obtenus compte-tenu de la variabilité des performances des animaux dans les tâches proposées. L'effectif requis chaque année est donc de 60 animaux.

Les animaux utilisés sont des rats mâles adultes Long-Evans qui ont déjà été testés dans le cadre d'un autre projet pour lequel une demande d'autorisation est déposée simultanément à la présente demande (demande intitulée Travail d'Etude et de Recherche en psychologie expérimentale animale).

500- Le projet s'inscrit dans le cadre d'une Unité d'Enseignement (UE) de l'Ecole doctorale Vie et Santé (intitulé : « Techniques d'étude du comportement des rongeurs en neurosciences »). D'une durée d'une semaine (deux formations par année universitaire, une en novembre et une en mai), cette UE constitue un module de la formation à l'expérimentation animale et s'adresse à des doctorants qui n'ont été que peu ou pas formés dans le domaine de l'étude du comportement animal au cours de leur cursus universitaire.

Cette formation (12 étudiants au maximum) inclut trois demi-journées de travaux pratiques pendant lesquelles des animaux sont utilisés, ces travaux pratiques faisant l'objet de la présente demande d'autorisation de projet. L'objectif de ce projet est de compléter la formation théorique des doctorants en matière de bonnes pratiques en expérimentation animale par une formation pratique mettant l'accent sur l'observation du comportement des animaux. Pour ce faire, sous la forme de petits ateliers, il leur est proposé d'apprendre à manipuler des animaux puis de pratiquer quelques tests comportementaux. Les tests proposés permettent l'évaluation des capacités sensori-motrices et cognitives ainsi que de la réactivité émotionnelle des animaux. Le choix de ces tests est guidé 1) par le fait que leur mise en œuvre ne nécessite pas de limiter le bien-être des animaux (pas de restriction alimentaire ou hydrique) et 2) parce que les tests proposés permettent d'ouvrir les discussions sur leur

utilisation dans des modèles animaux de pathologies humaines neurodégénératives et psychiatriques et d'aborder, dans ce contexte, les exigences en matière d'éthique animale.

Les animaux utilisés (36 par formation) sont des rats achetés auprès d'un fournisseur pour la première formation de chaque année universitaire et familiarisés à la manipulation avant le début des travaux pratiques ; ces animaux sont gardés en vie pour être utilisés dans un projet ultérieur pour lequel une demande d'autorisation est déposée simultanément à la présente demande (demande intitulée Ateliers techniques en neurosciences : comportement, et à l'issue de laquelle ils seront euthanasiés) : ces 36 rats seront donc testés deux fois. Pour la seconde formation, les 36 rats utilisés sont des animaux provenant de deux projets antérieurs (demande intitulée Travail d'Etude et de Recherche en psychologie expérimentale et demande intitulée Evaluation de l'apprentissage et de la mémoire chez le Rat de laboratoire) ; les 36 rats de cette seconde formation auront donc été testés trois fois et seront euthanasiés à l'issue de la seconde formation.