



**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 (4)

301- Nous avons identifié un nouvel agent pharmacologique « Liminib » qui présente une activité anti-tumorale et anti-métastatique in vitro. Notre objectif est d'évaluer l'intérêt thérapeutique de cette molécule et de confier ensuite son développement jusqu'aux phases cliniques à une société privée.

Par ailleurs, le composé Liminib n'a pas une solubilité optimisée. Après validation de l'intérêt thérapeutique de Liminib, notre objectif, dans le cadre de l'ANR Nanoluc, est de tester si Liminib complexé à des nanoparticules peut présenter une solubilité et des propriétés pharmacodynamiques améliorées, permettant de réduire les doses injectées aux animaux.

Nous avons déjà testé et validé cette molécule dans plusieurs modèles cellulaires in vitro. Nous avons montré dans une expérience précédente que la molécule a un impact sur la croissance tumorale et est très bien tolérée, et notamment beaucoup mieux que la chimiothérapie de référence (Paclitaxel).

Nous souhaitons maintenant évaluer l'efficacité anti-métastatique du composé in vivo. Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 4 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations. Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine.

Des cellules tumorales de cancer du sein humain (MDAMB231) exprimant de manière stable le gène de la luciférase seront injectées en intracardiaque chez la souris. Nous implanterons les cellules tumorales sur 40 animaux pour obtenir au moins 20 animaux avec une prise métastatique. En effet, d'après notre expérience, ce type d'injection présente un taux de réussite de 50% résultant d'une part de la difficulté du geste et d'autre part du risque de thrombose. Cependant la quantité de cellules injectées (2.10⁵) est définie de manière à diminuer au maximum ce risque. La dispersion métastatique sera suivie par imagerie de bioluminescence. Les souris sans métastases seront utilisées dans un autre protocole. Si plus de 20 souris ont des métastases, elles seront réparties uniformément dans les deux groupes et prises en compte dans la procédure expérimentale.

Dans ce projet nous utiliserons 40 souris Nude au total :

L'objectif est d'analyser par imagerie de bioluminescence la dispersion métastatique en présence ou absence de la molécule anticancéreuse Liminib (soit 2 conditions).

Pour cela nous allons dans un premier temps prétraiter les souris pendant 3 jours, en leur injectant quotidiennement en IP 100µL de la molécule Liminib ou 100µL du solvant seul.

Dans un deuxième temps nous allons injecter, dans la circulation sanguine (injection intracardiaque) des cellules tumorales de cancer du sein humain (MDAMB231) exprimant de manière stable le gène de la luciférase. D'après notre expérience, l'injection est réussie dans un cas sur deux. Sachant que 10 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable de l'effet thérapeutique du composé nous prévoyons le double de souris à injecter (soit 40 souris).

Nous analyserons ensuite par imagerie de bioluminescence l'apparition des métastases dans les deux conditions.

302- Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 1 Q 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer.

Il existe différents types de tumeur maligne de la vessie. Le carcinome transitionnel est la forme la plus fréquente (90 % des cancers de la vessie) suivi par le carcinome épidermoïde (7 %) et l'adénocarcinome (1 %). Les lésions non carcinomateuses correspondent aux lymphomes, sarcomes et tumeurs neuroendocrines de la vessie dont le traitement diffère des carcinomes.

La paroi interne de la vessie est tapissée de cellules transitionnelles qui sont à l'origine de la plupart des cancers de la vessie. L'évolution et la prise en charge dépend beaucoup du caractère invasif de la tumeur. On distingue le cancer superficiel de la vessie du cancer invasif, lequel, plus agressif, nécessite des traitements plus lourds. Le traitement des tumeurs de la vessie dépend de leur nature et de leur caractère infiltrant ou non et métastatique ou non. Les moyens thérapeutiques sont la chirurgie avec résection transurétrale, la cystectomie partielle ou totale et curage ganglionnaire, la radiothérapie externe, la chimiothérapie et l'immunothérapie avec traitement endovésical ou systémique.

Si le cancer superficiel reste de bon pronostic, le risque de rechute suite à la résection transurétrale des tumeurs reste élevé, ceci étant dû, en partie, aux tumeurs résiduelles non détectables par endoscopie conventionnelle. C'est pourquoi, une nouvelle technique consiste à procéder à une résection guidée par la fluorescence de molécules photoactivables (photosensibilisateurs) localisées préférentiellement dans les lésions tumorales. La molécule ayant reçu l'AMM en 2005 pour ce type de procédure est l'Hexvix®, une pro-drogue à base d'acide 5-aminolévulinique qui est métabolisée en un produit fluorescent (protoporphyrin IX) au niveau des tumeurs. Cependant, malgré le taux de tumeurs résiduelles significativement inférieur obtenu par cette méthode, le nombre de faux positifs est plus élevé que lors d'une résection classique. Ceci peut être imputé à l'imparfaite sélectivité tumorale du photosensibilisateur. D'autres inconvénients comme la fluorescence restreinte aux couches superficielles des tissus et la photodégradation rapide de la molécule incitent à rechercher des molécules plus performantes.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la diffusion d'une nouvelle génération de photosensibilisateurs (3 nouvelles molécules testées) administrés par instillation vésicale à 2 concentrations différentes et avec 2 temps d'incubation différents sur des tumeurs orthotopiques de vessie induites chez le rat femelle Fischer 344. Soixante-dix huit rats seront concernés à raison de 6 animaux par groupe. Les analyses seront effectuées à un stade de développement des tumeurs non invasif ce qui limite l'impact de la maladie sur l'animal. Les nouveaux composés qui seront testés ne sont pas génotoxiques pour les cellules et n'induisent pas d'allergie.

303- L'échographie cardiaque est un examen qui permet d'obtenir et de mesurer des images du cœur afin d'étudier son anatomie et sa fonction. Elle est généralement couplée à un électrocardiogramme (ECG) permettant de faire un tracé de l'activité électrique du muscle cardiaque.

D'un point de vue pratique nous utiliserons 2 groupes de 30 souris chacun que nous possédons habituellement au laboratoire.

Au cours de cette formation, nous nous attacherons à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en réutilisant les mêmes animaux tout en respectant un temps de repos après chaque mesure afin d'atteindre une reproductibilité fiable. Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées. A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des techniques alternatives pour étudier les fonctions cardiaques au niveau anatomique et fonctionnelle.

304- Le cerveau est capable d'une plasticité fonctionnelle et structurelle remarquable pendant le développement et qui persiste chez l'adulte. Comme interface fonctionnelle entre neurones, les épines dendritiques sont impliquées dans la computation des réseaux neuronaux. Des avancées récentes indiquent qu'une fois établies, les synapses peuvent être maintenues pendant de longues périodes de temps. Mais elles peuvent aussi être éliminées ou branchées vers de nouveaux réseaux neuronaux en réponse aux changements environnementaux. L'étude de la fonction des glucocorticoïdes a contribué à notre compréhension de ce phénomène. Cette hormone qui circule dans le milieu sanguin selon les rythmes circadiens et sensible au stress a des effets très complexes sur l'apprentissage et la mémoire.

Quand l'apprentissage se fait lors du pic circadien de glucocorticoïdes, la performance comportementale est optimale et s'accompagne de la formation de nouvelles épines dendritiques, compensées par l'élimination d'épines préexistantes. En revanche, une exposition prolongée aux glucocorticoïdes produit une perte nette d'épines dendritiques qui coïncide avec une détérioration cognitive. La mémoire pourrait donc être codée par des motifs d'épines qui résultent d'un processus dynamique de formation et d'élimination. Nos objectifs sont de trois ordres. (i) Etablir un modèle prédictif d'organisation dynamique des synapses inhibitrices et excitatrices selon la performance comportementale. (ii) Définir combien la dynamique des synapses inhibitrices et excitatrices est vulnérable au stress et dérégulation des rythmes circadien de glucocorticoïdes qui se manifestent dans de très nombreuses maladies neuropsychiatriques. (iii) Caractériser de nouveaux points d'entrée des mécanismes moléculaires et voies de signalisation de la formation et l'élimination d'épines dendritiques qui sont impliquées dans les maladies liées au stress. Le rationnel de nos études se base sur des observations cliniques qui ont révélées un rôle prédominant des glucocorticoïdes et facteurs neurotrophiques (BDNF, ...) dans de nombreuses maladies de l'affect liées au stress. Nous prenons avantage de la souris comme modèle pour disséquer le rôle de BDNF dans les voies de signalisation des glucocorticoïdes impliquées dans la dynamique des réseaux de connectivité neuronaux. L'emploi d'un modèle de souris récapitulant une mutation fonctionnelle du gène humain de BDNF présente l'avantage considérable de produire des données scientifiques pertinentes pour la population porteuse de la mutation qui présente notamment des troubles cognitifs, exécutifs et dépressifs. Pour mesurer la dynamique des synapses suite à l'apprentissage, nous utilisons la microscopie bi-photonique in vivo des épines dendritiques identifiable in vivo grâce à un marqueur fluorescent exprimé dans la souris transgénique Thy1-YFP. Le croisement de nos deux lignées permettra d'investiguer les interactions entre BDNF, dynamique des épines et

traitements pharmacologiques par des glucocorticoïdes. Cette approche in vivo est basée sur le suivi des mêmes animaux ce qui offre un plus grand pouvoir statistique. L'utilisation de méthode statistique de détermination à priori du nombre total d'animaux nécessaire à notre étude fait état de 630 souris et 90 rats. Si possible, nous utiliserons des systèmes de cultures primaires in vitro pour répondre aux questions mécanistiques et réduire le nombre d'animaux utilisés. Cela concerne notamment les criblages de gènes et protéome pour identifier de nouveaux mécanismes moléculaires qui calibrent les activités de BDNF et glucocorticoïdes.

305- Notre projet consiste à mieux comprendre les mécanismes physiologiques des bénéfices thérapeutiques observés dans des protocoles de stimulations cérébrales profondes chez des patients atteints de troubles obsessionnels compulsifs (TOC) résistants. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiées qui souffrent de comportements compulsifs aigus. Pour ce projet nous envisageons de réaliser des tâches comportementales et comparer les performances des souris mutantes par rapport à des souris témoins (estimation de 60 à 90 souris nécessaires pour l'ensemble du projet). Nous proposons de traiter les souris mutantes avec des stimulations optiques de sous-populations cellulaires (technique dite d'optogénétique) de circuits neuronaux identifiés pour être responsable de symptômes compulsifs. Cette approche nous permettra de mieux identifier les effets des stimulations cérébrales profondes chez l'homme pour le traitement des TOCs.

306- 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 fibrose du foie. 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 cette pathologie, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il s'avère donc nécessaire d'utiliser un modèle animal qui récapitule les différents aspects de la pathologie humaine, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Les animaux utilisés dans ce projet seront des rongeurs (souris et rats) car la fibrose induite dans ces deux espèces est considérée comme suffisamment prédictive de l'efficacité de composés chez l'homme. La majorité des animaux utilisés dans ce projet seront exposés régulièrement à des injections répétées d'un produit chimique déclenchant une inflammation dans le foie, avec pour conséquence à moyen terme l'apparition d'une fibrose en quelques semaines. Les signes cliniques attendus sont modérés (perte de poids transitoire consécutive à chaque exposition à l'agent chimique). 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 50% de la fibrose dans le foie.

Ce projet nécessitera une utilisation moyenne de 700 souris et de 300 rats par an.

307- Problème de santé publique majeur, l'addiction correspond à un état psychopathologique au cours duquel l'obtention, la prise répétée et l'impossibilité de s'abstenir représentent une perte de contrôle sur la prise de drogues. Dans la dépendance à certaines drogues ou à certains médicaments, de façon similaire à l'homme, l'arrêt de la prise entraîne chez le rongeur l'émergence d'un syndrome de sevrage. Ce syndrome peut alors être évalué chez le rongeur par différentes approches comportementales, neurochimiques et électrophysiologiques. En se basant plus particulièrement sur l'approche comportementale des syndromes de sevrage, l'objectif de ce projet est double:

1) Evaluer les risques de dépendance induite par certains nouveaux composés candidats médicament en cours de développement. Cette évaluation est exigée par les instances réglementaires.

2) Evaluer les effets sur les syndromes de sevrage de nouveaux composés qui pourraient être utiles comme outil thérapeutique pour le traitement de la dépendance aux drogues ou à certains médicaments et les comparer le cas échéant aux molécules déjà existantes.

Ce projet de 5 ans établi en conformité avec exigences de remplacement, de réduction et de raffinement prévoit l'utilisation d'un maximum de 360 rats et de 360 souris afin d'atteindre l'objectif 1 (procédure expérimentale 1), et l'utilisation d'un maximum de 7200 rats et de 7200 souris afin d'atteindre l'objectif 2 (procédures expérimentales 2,3 et 4).

308- Dans le contexte général actuel de méfiance autour du médicament, il est important de reconnaître les problèmes potentiellement liés aux génériques. En effet, si un générique contient obligatoirement la même molécule active que le princeps, il peut être fabriqué avec des excipients différents or ces derniers ne sont pas neutres. Un générique doit prouver sa bioéquivalence avant sa mise sur le marché mais cela ne garantit pas une équivalence thérapeutique et une efficacité similaire entre les deux produits.

L'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé) a en effet été confrontée depuis le mois d'août 2010 à des interrogations relatives à l'efficacité de génériques de la vancomycine suite à la publication d'un article polémique par une équipe colombienne. Le mode d'obtention particulier de cet antibiotique par voie de fermentation à partir de micro-organismes est au centre de ces débats car les produits obtenus par ce biais présentent, de façon générale, des compositions moins bien définies que pour ceux obtenus par synthèse chimique.

La vancomycine est un antibiotique injectable régulièrement prescrit dans le traitement d'infections sévères et notamment à *Staphylococcus aureus*. De plus, compte tenu de l'arrêt de la production du produit de référence, la vancomycine est commercialisée en France exclusivement sous forme de médicaments génériques depuis 2002.

L'étude colombienne n'ayant pas été réalisée sur des génériques français, le but de notre travail sera d'évaluer et de comparer l'efficacité thérapeutique *in vivo* de plusieurs génériques de vancomycine actuellement commercialisés à celle du médicament de référence sur une souche de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Les différentes poudres seront évaluées dans un modèle expérimental d'endocardite chez le lapin. 24 heures après l'introduction d'un cathéter dans le ventricule gauche sous anesthésie générale, une infection bactérienne sera induite par voie intraveineuse. Les animaux seront alors répartis dans 2 groupes : animaux contrôles (mise à mort avant traitement) et animaux traités (mise à mort après traitement de 48 heures). Après numération des bactéries survivantes dans les végétations et dans la rate, les résultats obtenus pour les deux groupes seront comparés par un test statistique approprié. Afin de mener à bien le projet, le nombre total d'animaux a été estimé à 50 lapins néo-zélandais.

309- Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est une affection virale caractérisée par des problèmes de reproduction chez les truies et des troubles respiratoires chez les animaux en croissance. Cette maladie, apparue en Europe de l'Ouest au début des années 90, présente aujourd'hui une prévalence très élevée dans certaines régions (plus de 60% en Bretagne). Cette infection conduit à des pertes économiques considérables ainsi qu'à une utilisation importante d'antibiotiques en élevage en raison des complications bactériennes secondaires. Parmi les mesures de lutte contre l'infection, la vaccination est la plus utilisée sur le terrain. Les vaccins disponibles ont cependant une efficacité limitée, puisque s'ils limitent les conséquences cliniques, ils ne permettent pas de bloquer la circulation du virus en élevage. Le développement de vaccins plus efficaces passe par une meilleure connaissance de la réponse immune de l'hôte contre le virus du SDRP. Cette réponse est en effet encore mal connue, en particulier au niveau du poumon qui est l'organe cible du virus. L'objectif de ce projet est donc de fournir des données complètes sur la réponse immune à cette infection chez le porc au niveau pulmonaire et sanguin. Les données générées permettront par la suite de paramétrer un modèle mathématique de la réponse immune à ce virus. Dans l'avenir, ce modèle mathématique pourra être utilisé dans la conception de nouveaux vaccins et il permettra à terme de diminuer les besoins en essais sur animaux.

Description du projet

Ce projet se compose de 2 procédures préliminaires (n°1 et 2) et de l'étude de la réponse immune à l'infection SDRP proprement dite (procédure n° 3). Les deux procédures préliminaires ont pour objectif de permettre l'acquisition des connaissances nécessaires à la réalisation de la dernière procédure. La première (procédure n° 1) qui nécessitera 12 animaux visera à définir le protocole d'anesthésie le plus sûr et le plus efficace pour la réalisation de lavages broncho-alvéolaires (LBA). Elle permettra également de vérifier que les LBA répétés ne modifient pas la composition cellulaire des liquides de LBA.

La seconde procédure préliminaire (procédure n° 2) visera à caractériser l'infection par la souche SDRP Léna. Cette souche n'a pas été étudiée jusqu'ici dans notre laboratoire. Les données de la littérature nous indiquent que l'infection de porc exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) pourrait induire de la fièvre et des symptômes respiratoires, mais pas de mortalité. Cette procédure nécessitera 15 animaux.

Au cours de la procédure n°3 nous étudierons la réponse immune face à 2 souches de SDRP avec des niveaux de pathogénicité différents, une souche de SDRP de pathogénicité modérée et une souche hautement pathogène (souche Léna). Au total, 18 porcs seront utilisés, témoins compris et seront suivis pendant 42 jours après infection. A chaque point de suivi, tous les animaux seront anesthésiés pour réalisation d'un LBA et d'une prise de sang. Le recours systématique à l'anesthésie permettra de diminuer très nettement le stress et l'inconfort des animaux au moment des LBA. Les analyses réalisées sur les prélèvements broncho-alvéolaires et sanguins permettront de caractériser finement la réponse immuno-virologique à l'infection SDRP.

310- Tous les jours, les éleveurs d'ovins sont amenés à soigner des animaux malades ou à utiliser des médicaments de manière préventive. Pour les brebis laitières, des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits dans le lait destiné à la consommation humaine. Ces études permettent de fixer le temps pendant lequel le lait doit être jeté et non consommé suite à l'administration d'un médicament vétérinaire

La procédure consiste à l'administration du médicament dans les conditions normales d'utilisation. Elle est suivie par des prélèvements de lait lors des traites et par l'analyse du (des) produits dans ces échantillons. Une courbe d'élimination peut ainsi être tracée et permet de définir la date à laquelle les limites maximales acceptables de résidus sont atteintes. Avant et possiblement après l'administration, des prises de sang seront réalisés afin de suivre la santé de l'animal. L'hébergement s'effectue dans les conditions normales d'hébergement de ces animaux chez un éleveur ou dans nos hébergements.

Le but du projet est de tester 10 formulations; ces études décrites dans le VICH GL 48 doivent être menées sur des groupes de 20 brebis laitières par formulation (soit un total de 200 animaux), sur une période excédant le temps prévu d'élimination (soit en moyenne 1 mois). Deux études par an sont programmées, la durée totale du projet est donc de 5 ans.

311- En 2010 s'est créé le projet Bionique « Système Embarqué pour la Santé (SES) » réunissant plusieurs axes spécialisés ou transversaux pour définir plusieurs projets innovants. Il est clairement admis aujourd'hui que l'interface entre les systèmes embarqués pour la santé et les milieux biologiques constituent un verrou important. Ces interfaces sont particulièrement critiques pour la suppléance dans deux domaines médicaux majeurs : la neurologie et la cardiologie. Pour mémoire nous rappelons que ces 2 domaines représentent 90% des implants.

Le projet FibroSES, s'inscrit dans l'axe SES et doit permettre d'analyser in situ si la mesure de l'impédance de contact tissu/électrode peut permettre d'extraire un indicateur de l'état de la fibrose sur un matériau implanté. L'approche exploratoire choisie repose sur la spectroscopie d'impédance. A terme, le but est de proposer une instrumentation embarquée pour le suivi en temps réel de l'évolution de la fibrose, et de concevoir des techniques qui :

- i) soit la réduisent (ex : optimisation/fonctionnalisation du matériau)
- ii) soit compensent son effet (ex : solution de traitement embarqué)
- iii) soit la favorisent dans les cas où son effet apporte un bénéfice à la tenue de l'implant.

Aujourd'hui, le marché des dispositifs médicaux implantables est estimé à 40 milliards de dollars, avec une croissance annuelle moyenne d'environ 8%. D'ici 2014, le chiffre d'affaires global devrait s'approcher des 50 milliards.

Les dispositifs médicaux ou DM (ex : pacemaker, stimulateurs et resynchroniseur cardiaque, stent, implants rachidiens, oculaire, cochléaire...) jouent un rôle prépondérant dans les diagnostics médicaux, le traitement des patients, les interventions chirurgicales. Ces DM sont implantés sur des patients de plus en plus jeunes. Le devenir et l'efficacité de ces DM sont en outre liés à l'état inflammatoire du biomatériau ou du DM implanté. En effet certaines cellules du tissu conjonctif de l'organe, appelées fibroblastes, prolifèrent, produisent des facteurs de croissances, de la matrice extracellulaire riche en collagène. Deux situations peuvent apparaître. Il peut y avoir cicatrisation et donc élimination de ce néo tissu ou inversement entraîner un processus irréversible de réaction « inflammatoire » chronique, pouvant être néfaste au tissu cicatriciel. Elle peut aussi dans certaines circonstances être considérée comme un bénéfice pour le maintien d'un implant. Cette réaction dite fibrotique est déterminante pour étudier le comportement in situ de DM et/ou biomatériau, et permettre ainsi d'envisager et d'adapter des approches technologiques et biologiques du DM, dans le but d'améliorer son adaptation pour un tissu concerné, et ainsi être considérée comme un bénéfice pour le patient.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'évolution dans le temps de la fibrose sur un dispositif embarqué (manchon périovasculaire). Cette quantification sera démontrée par spectroscopie d'impédance et analysée par méthode immunohistochimique. Cette étude est une étude préliminaire ce qui implique un nombre d'animaux restreint : 6 porcs.

312- Notre objectif est de développer des vaccins contre les maladies infectieuses en utilisant l'approche de ciblage des cellules dendritiques (DC), cellules clé de la mise en place de l'immunité. Cette stratégie fonctionne très bien dans le modèle murin mais n'a pas encore été évaluée chez les espèces d'intérêt vétérinaire. Nous disposons d'anticorps contre les cellules dendritiques de moutons qui serviront à faire des plateformes vaccinales anti-DC par conjugaison moléculaire avec des antigènes viraux. Dans cette demande d'autorisation de projet, nous voulons démontrer que les anti-DC ciblent les cellules dendritiques de la peau de mouton après injection intradermique

313- L'objectif de notre projet de recherche est de comprendre les interactions entre *E. faecalis* et son hôte in vivo au niveau du tractus intestinal. *E. faecalis* est une bactérie commensale appartenant à la flore sous dominante du microbiote adulte humain et murin. Bien qu'inoffensive pour les individus sains, *E. faecalis* est à l'origine d'un nombre croissant d'infections opportunistes chez des personnes immunodéprimées ou affaiblies. Jusqu'à présent, l'existence de modèles animaux peu adaptés pour l'étude du processus infectieux d'*E. faecalis* a limité notre connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les interactions entre *E. faecalis* et son hôte. Nous proposons d'adresser cette problématique en développant un nouveau modèle animal fondé sur l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur "x" pour lesquelles une augmentation de la translocation des entérocoques endogènes a récemment été observée. Notre projet comprend 4 axes de recherches: 1/ l'analyse de l'étape de translocation, 2/ la caractérisation de la réponse immunitaire mucoale contre *E. faecalis*, 3/ la détermination des mécanismes mis en jeu dans les interactions entre *E. faecalis* et l'hôte et 4/ l'impact de bactéries probiotiques sur ces interactions. Les fondements de ce projet résident dans l'utilisation de ce nouveau modèle animal et d'une souche d'*E. faecalis* qui sera inoculée aux souris. Cette approche expérimentale permettra d'intégrer la complexité des interactions entre le microbiote intestinal, l'hôte et un pathogène opportuniste issu de ce microbiote. A ce jour, aucune approche in vitro n'est disponible pour remplacer ce type de modèle et "mimer" ces interactions. Afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés, nous porterons une attention particulière à la validation du modèle et à l'établissement des conditions expérimentales. Nous veillerons à ce que la réalisation de ce projet soit conforme aux exigences de raffinement liées à l'expérimentation animale. Les souris seront hébergées en petit nombre, ne seront pas soumises à des périodes de jeûne pendant la durée de l'expérience et seront inoculées avec des doses sous létales établies pour la souche sauvage d'*E. faecalis*. L'ensemble du projet nécessitera en moyenne 100 souris par an.

314- Le projet vise à évaluer en laboratoire la tolérance locale et générale de vaccins vétérinaires selon la pharmacopée européenne 04/2013 :50206 (p. 5275 à 5277) dans le cadre réglementaire du développement des dits vaccins.

Le projet répondant à des contraintes réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit.

Le nombre d'animaux utilisés est fonction de l'espèce cible ainsi que du vaccin étudié.

La pharmacopée fixe un minimum de 8 (mammifères) adaptable en fonction du vaccin; le nombre d'animaux est défini de façon à ce que le projet puisse permettre une évaluation correcte de la tolérance au vaccin; en pratique le nombre d'animaux peut être augmenté à 15 par groupe. Le nombre de groupe dépend du nombre de lots de vaccins testés, soit pour 2 à 4 groupes, de 16 à 60 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 600 animaux maximum sur la période de 5 ans.

Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux.

Le bien être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires.

315- La réovirose est une maladie virale à transmission verticale provoquant des troubles locomoteurs importants et caractéristiques sur les poulets de chair. Les réovirus sont également suspectés de participer à des troubles digestifs. La maladie touche essentiellement les poulets de chair souche label ou conventionnelle.

La prévention de cette maladie repose sur une vaccination des reproducteurs à l'aide de vaccins vivants et inactivés.

Depuis 2011 sont apparus plusieurs cas de réovirose sur des poulets de chair, de souche label ou standard. De nombreuses analyses ont été effectuées mettant en évidence un nouveau réovirus non couvert par les vaccins utilisés sur le terrain. Ce réovirus est apparu très pathogène, provoquant des épisodes cliniques importants sur la descendance des lots de reproducteurs affectés et entraînant également des retards de croissance sur des lots de poussins ayant été en contact avec les lots atteints dans le couvoir.

La mise au point d'un nouveau vaccin efficace contre ce virus permettrait d'enrayer sa diffusion.

Les essais prévus sur animaux sont ceux uniquement réalisables sur animaux. Le test, permettant de vérifier l'inactivation du principe actif viral du vaccin, est réalisé sur des cultures cellulaires, ce qui permet d'éviter l'utilisation d'animaux.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque essai est celui exigé par la pharmacopée européenne. Pour les essais mis en place pour obtenir des informations scientifiques, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats significatifs.

Les surfaces d'hébergement sont en accord avec la directive 2010 63 UE.

Les conditions d'hébergement sont vérifiées quotidiennement (éclairage, température, hygrométrie, nourriture, abreuvement).

Une procédure d'évaluation des points limites des animaux est mise en place. Cela permettant d'évaluer toute douleur physique ou psychique sévère, souffrance ou état moribond ; et le cas échéant un arrêt du protocole, sa modification, l'administration d'un traitement symptomatique, voire l'euthanasie de l'animal est réalisée.

L'état des animaux est vérifié quotidiennement par une personne compétente, et le vétérinaire responsable est consulté afin de prendre d'éventuelles mesures nécessaires.

Ces essais seront réalisés sur la poule domestique, il s'agit de l'espèce cible du vaccin, sensible au réovirus, permettant d'apporter les informations les plus pertinentes.

Un minimum de 75 animaux utilisés est prévu pour le développement, puis 10 par lot de vaccin.

316- La broncho-pneumopathie chronique obstructive, abrégée BPCO, est un groupe de maladies chroniques systémiques d'origine respiratoire, atteignant les bronches. Au niveau respiratoire, la BPCO est caractérisée par une obstruction lente et progressive des voies aériennes et des poumons, associée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires avec destruction des parois alvéolaires. Chez le patient atteint de BPCO, le métabolisme anaérobie (sans oxygène) est préférentiellement sollicité, au détriment du métabolisme aérobie. L'entretien et la restauration du fonctionnement du métabolisme aérobie (avec oxygène) apparaît aujourd'hui comme un enjeu majeur de réadaptation en faveur de la qualité de vie des patients souffrant de BPCO. Les modèles animaux de BPCO diffèrent par leur mode d'induction, leur durée, leur intensité et le niveau d'activation du système immunitaire. L'intérêt du modèle d'inflammation pulmonaire chronique obstructive par lipopolysaccharide (LPS) est d'induire une inflammation localisée permettant d'étudier une inflammation aiguë ou chronique en agissant sur la dose, la fréquence et la durée de sensibilisation au LPS.

Notre but est de mettre en évidence les modifications de la structure pulmonaire ainsi que les cellules immunitaires activées dans un modèle BPCO aiguë chez la souris C57BL/6.

Ce projet s'effectuera sur modèle murin car l'étude des modifications structurales et immunitaires ne pourrait se faire d'une manière alternative. Le modèle murin présente des qualités en termes de manipulation, d'hébergement et de reproductibilité technique.

L'étude portera sur 120 souris C57BL/6, afin d'obtenir un nombre réduit de souris par groupe mais suffisant pour l'analyse des données recueillies. Les individus entrant dans l'étude devront présenter un état physique et un comportement normal en accord avec leur espèce. Leurs consommations alimentaire et hydrique ainsi que leur poids seront mesurés tous les jours. Les animaux ne devront pas perdre plus de 10% de leur poids d'origine durant l'étude. Un contrôle de l'absence de signes de

détresse respiratoire et de douleur sera effectué quotidiennement tout au long de l'étude. Les animaux ne répondant pas à ces critères seront exclus de l'étude et une prise en charge en conformité avec les recommandations éthiques sera effectuée.

317- L'internalisation cellulaire de la cobalamine (Cbl, vitamine B12) chez les mammifères est médiée par des récepteurs exprimés à la surface membranaire. La transcobalamine (TC), protéine plasmique sécrétée par les cellules endothéliales, fixe la Cbl, et ce complexe (Holo-Transcobalamine) est reconnu par le récepteur (TCbIR, ou CD320) puis internalisé par endocytose. La TC est ensuite dégradée dans le lysosome et la cobalamine ainsi libérée est convertie en méthyl cobalamine (cofacteur de la Méthionine synthase (MTR), enzyme cytosolique) ou en adénosyl cobalamine (cofacteur de la Méthylmalonyl-coenzyme A mutase (MMCM), enzyme mitochondriale).

La MTR catalyse le transfert du groupe méthyle du 5-méthyltétrahydrofolate sur l'homocystéine pour former de la méthionine et du tétrahydrofolate. Aussi, une déficience en B12 conduira à une hyperhomocystéinémie (facteur de risque associé à des maladies cardiovasculaires et/ou neurodégénératives) ainsi qu'à un désordre des régulations épigénomiques dépendantes de la disponibilité en S-adénosylméthionine pour les réactions de transméthylation (méthylation d'ADN, protéines, hormones, etc.).

D'un autre côté, la MMCM catalyse la conversion du méthylmalonyl-coA en succinylcoA, intermédiaire du cycle de Krebs, et une déficience en Cbl conduira à un blocage métabolique aboutissant à une acidémie méthylmalonique.

Nous souhaitons utiliser un modèle de souris transgénique exprimant un transgène conduisant à la protéine CD320 inactive, et cela dans le but d'étudier plus en détail les mécanismes physiopathologiques en lien avec une déficience en vitamine B12. Une étude comportementale chez ces animaux sera menée également afin de corrélérer les données biochimiques aux troubles neurologiques qui pourraient découler de cette déficience. La perspective à plus long terme, en fonction des résultats, sera de soumettre ces souris à différents régimes, carencés en donneurs de méthyles ou supplémentés en folates et vitamine B12

Les cellules embryonnaires de souris TCbIR/CD320 (-/-) sont générées au Sanger Institute grâce à une technologie de type « trap gene », et sont issues du Mouse Genome Center, UC Davis, CA (USA). Le gène mutant TCbIR/CD320 a été produit dans la souche de souris C5781/6 N en utilisant des cellules souches hétérozygotes. La souris mutante TCbIR/CD320 a été générée par croisement d'hétérozygotes. La production des souris mutantes TCbIR/CD320 et l'élevage ont été effectués selon les recommandations du NIH et le protocole a été approuvé par le AALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International).

Résultats attendus : Troubles neurologiques en lien avec un défaut de myélinisation des cellules nerveuses, typique des patients souffrant d'un déficit sévère en vitamine B12.

318- Les calpaïnes sont des protéases, des enzymes qui dégradent d'autres protéines. Elles sont présentes dans toutes les cellules de l'organisme et participent au développement de l'inflammation tissulaire en permettant la mobilisation de cellules immunitaires. Leur action est limitée par un inhibiteur, la calpastatine, qui est également présent dans toutes les cellules. Notre équipe étudie depuis de nombreuses années l'implication des calpaïnes dans l'inflammation et a développé dans ce but des souris transgéniques de la lignée C57/bl6 dont tous les tissus expriment la calpastatine en excès (souris CalpTG), permettant de bloquer un excès d'activité des calpaïnes. Cet outil a permis de démontrer que l'activation des calpaïnes au cours de l'inflammation participe aux lésions observées dans différents modèles d'atteinte rénale (glomérulonéphrite, hypertension artérielle...).

Le but de cette étude initiée en 2008 est de déterminer si les calpaïnes jouent un rôle dans les processus de vieillissement et par quels mécanismes.

En effet, nous avons observé que les souris CalpTG sont protégées contre les lésions liées au vieillissement, notamment le vieillissement rénal, vasculaire et cutané. Ce projet avait été approuvé par notre comité d'éthique et un brevet protégeant cette invention a été déposé en 2012.

Notre objectif est simplement de laisser vieillir durant 2 années de souris CalpTG et contrôles (20 souris de 2 ans au total et 20 souris contrôles âgées de 2 mois soit 40 animaux au total, voire 60 dans le cas le plus défavorable) afin d'analyser leurs tissus pour comprendre quels mécanismes sont à l'œuvre dans cette protection contre le vieillissement. D'autre part, une analyse des modifications de régulation des gènes (épigénétique) de ces animaux sera réalisée en collaboration avec une équipe allemande spécialisée dans l'épigénétique du vieillissement afin d'analyser les modifications survenant chez ces animaux par rapport aux contrôles et au cours du temps. Le projet a été optimisé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, suivant la règle des 3Rs (Reduce), à savoir 10 par groupe, en utilisant les organes à la fois pour la quantification de l'inflammation et du stress oxydant (projet initial) et de récupérer l'ADN (CHIPs). Les organes prélevés chez ces animaux serviront donc à plusieurs types d'analyses ultérieures, suivant la règle des 3Rs (Refine). Cette étude ne peut se faire qu'à l'aide de souris transgénique (pas de solution de remplacement).

Cette recherche est justifiée afin de mieux comprendre les mécanismes du vieillissement, notamment rénal et vasculaire afin d'envisager de nouvelles thérapies.

319- Le contexte du projet concerne la caractérisation d'un modèle carcinose péritonéale chez le lapin basé sur le modèle tumoral VX2.

En effet, les cancers digestifs et ovariens développent fréquemment des carcinomes péritonéaux. Elles sont en règle générale caractérisées par la présence de nodules tumoraux dans la cavité péritonéale. A ce jour, pour ralentir l'évolution du cancer, une thérapie multimodale est nécessaire intégrant la chimiothérapie systémique, la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale, la cyto-réduction chirurgicale ainsi que l'utilisation d'anticorps antiangiogéniques.

La molécule anti-angiogénique étant inactive chez le rongeur, cette dernière approche n'est pas réalisable. Le développement de ce modèle a alors été réalisé chez le lapin au sein de notre laboratoire afin de le caractériser.

Après une phase de caractérisation macroscopique de la cinétique du modèle, il est nécessaire d'envisager des techniques permettant un suivi longitudinal de l'évolution de la maladie afin, notamment de réduire le nombre d'animaux nécessaires dans les études à venir.

Il s'agit ici de valider, chez le lapin, la faisabilité de mise en place d'un protocole d'imagerie dans le but de caractériser plus précisément la cinétique du modèle de carcinome péritonéal et de tester par la suite des anticorps antiangiogéniques. Les modalités d'imagerie envisagées sont l'IRM, la TEP ainsi qu'une exploration en coelioscopie.

320- Au cours du cursus des études pharmaceutiques, les étudiants doivent acquérir des connaissances approfondies concernant le mode d'action des médicaments et leurs effets pharmacologiques. Les enseignements de Pharmacologie y pourvoient sous la forme d'enseignements théoriques et sous la forme de travaux pratiques. Ces derniers ont pour but de confronter les étudiants à des expériences types de pharmacologie. Le Pharmacien ainsi formé doit pouvoir accéder à des formations complémentaires de 3^m cycle (Master II, thèse de doctorat), intégrer un laboratoire de recherche, comprendre et analyser de manière critique les résultats d'études de pharmacologie expérimentale (articles scientifiques ...).

-Lors d'une première séance de TP d'entraînement à la manipulation des souris, les étudiants mettent en œuvre une expérience de « tout ou rien » avec détermination d'une DE50 (expérience proche de la détermination de la DL50, le traumatisme engendré par la mort de l'animal en moins), en étudiant l'effet de doses croissantes d'un anesthésique sur l'endormissement de la Souris.

-Dans le cadre des TP d'initiation à la psychopharmacologie, les étudiants sont confrontés à différentes épreuves comportementales couramment utilisées pour mettre en évidence des effets anxiolytiques (ou anxiogènes), antidépresseurs ou antipsychotiques, en testant des substances pharmacologiques de référence.

-Les étudiants mettent également en œuvre différentes épreuves largement utilisées chez la Souris pour évaluer l'effet antalgique d'un médicament.

Actuellement, le *numerus clausus* au concours de Pharmacie s'élève à 85 étudiants par promotion, répartis en 5 groupes. Au sein de chaque groupe, les étudiants sont divisés en sous-groupes de façon à fonctionner sur un mode « séances tournantes ». Lors de chaque séance, chaque sous-groupe de 2-3 ou 3-4 étudiants réalise une expérience choisie parmi des protocoles différents. La plupart des épreuves proposées, réalisées chez la Souris, sont jugées de gravité légère, selon l'annexe de l'arrêté du 1/2/13 régissant l'évaluation de projet. De ce fait, dans le but de diminuer le nombre total d'animaux utilisés, ces souris sont réutilisées une fois, après une période de repos, pour une autre épreuve de classe légère. Cela conduit à utiliser environ 900 souris par an.

321- Le genre Pestivirus regroupe actuellement trois virus identifiés depuis de nombreuses années: celui responsable de la peste porcine classique (Hog Cholera Virus: HCV) dont l'infection était déjà décrite dès le XIX^e siècle, celui responsable de la diarrhée virale bovine (bovine virus diarrhoea virus: BVDV) et de la maladie des muqueuses, et le virus de la maladie de la frontière (Border Disease Virus) chez le mouton.

Ces pestiviroses sont un sérieux problème pour l'économie de l'élevage.

La transmission des pestivirus entre faune sauvage et domestique a été démontrée pour certains virus, mais reste discutée pour d'autres. Cette transmission inter-espèces pose cependant d'importants problèmes pour l'élaboration de plan d'éradication des pestiviroses chez les espèces domestiques et fait l'objet de nombreuses recherches.

L'infection d'un porc par le virus de la Peste Porcine se traduit par des symptômes variables en fonction de la virulence de la souche, mais également de l'âge de l'animal, de son état physiologique et du stade de développement fœtal. La Peste Porcine est une septicémie virale hautement contagieuse qui, dans sa forme aiguë, est mortelle.

Pendant des décennies, la Peste Porcine a représenté la dominante de la pathologie infectieuse porcine.

En effet, c'est une maladie économiquement importante car très contagieuse et produisant de hauts taux de mortalité, en particulier parmi les jeunes animaux.

Malgré un plan de surveillance et de lutte contre le virus à l'échelle Européenne, qui a réduit son incidence, la Peste Porcine reste encore une menace économique importante.

Dans les conditions naturelles, le virus de la Peste Porcine infecte son hôte par la voie oro-nasale et se multiplie au niveau des cellules épithéliales des amygdales. Le virus envahit ensuite, via les vaisseaux lymphatiques, les ganglions lymphatiques drainants puis atteint les capillaires sanguins. De là, une grande quantité de virus est produite au niveau de la rate, de la moelle osseuse, de l'appareil digestif et des ganglions lymphatiques viscéraux. Cela se traduit par la présence d'une grande quantité de virus dans le sang entraînant l'invasion des reins, de la thyroïde, de l'appareil respiratoire, du système nerveux central.

Bien que la vaccination soit interdite au sein des pays de l'Union européenne (car la vaccination induit une réponse immunitaire, qui empêche de distinguer lors de tests de dépistage, les animaux vaccinés des animaux infectés par le virus), les études sur la fabrication de vaccins faisant appel aux nouvelles technologies sont toujours l'une des préoccupations des chercheurs.

En effet, d'une part, les pays tiers pratiquent toujours la vaccination et, d'autre part, un pays de l'Union européenne, concerné par une épizootie de Peste Porcine, peut soumettre un plan de vaccination d'urgence à la Commission européenne et être autorisé à pratiquer cette vaccination afin d'éviter l'extension de la maladie (directive 80/217/EEC, article 14.2, du 22 janvier 1980).

Le présent projet ne comporte qu'une seule procédure expérimentale sur cinq porcs en période post-sevrage, afin de réaliser un suivi préliminaire de la cinétique de l'immunité après vaccination contre la Peste Porcine (avec des fragments de virus), et de créer une banque de sérum contenant des anticorps.

Les gestes réalisés seront des gestes de pratique vétérinaire courante: vaccination et prise de sang.

322- En raison de l'utilisation croissante de nanoparticules dans les procédés industriels, le nombre des salariés pouvant être exposés augmente sans que pour autant les propriétés toxicologiques de ces substances soient parfaitement connues. Parmi celles-ci se trouvent les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) qui appartiennent à la liste des nanomatériaux manufacturés d'intérêt de l'OCDE (OCDE, 2010).

Comme ces particules peuvent se retrouver en suspension dans l'air, la voie majeure d'exposition professionnelle est l'inhalation et les premiers tissus exposés sont ceux de l'appareil respiratoire. Une fois déposés dans le poumon, ces nanomatériaux peuvent rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme. Ils pourraient alors avoir des effets neurotoxiques soit en pénétrant directement dans le cerveau soit en altérant les fonctions de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Toutes les classes d'âge de la population active peuvent être exposées aux nanoparticules et il est probable que les effets toxicologiques induits par une exposition à des nanomatériaux soient différents chez un salarié jeune et chez un salarié âgé. Cet aspect de la toxicologie des nanoparticules n'a pas encore fait l'objet de travaux approfondis.

Les études de poste concernant les opérations mettant en œuvre des nanomatériaux sous forme de poudre indiquent que les aérosols auxquels sont potentiellement exposés les salariés sont composés en très grande majorité de particules sous forme agrégée ou agglomérée. Cependant il n'est pas à exclure qu'au cours de leur utilisation, des procédés mécaniques pourraient modifier la structure de la nanopoudre et conduire à la génération d'un aérosol ayant une granulométrie différente de celle obtenue lors de la manipulation de la poudre originale. Il est donc nécessaire de savoir si deux aérosols de granulométrie distincte mais obtenus à partir d'un même échantillon de nanopoudre peuvent avoir des propriétés toxicologiques différentes que ce soit en termes de réponse inflammatoire et de bio-persistance pulmonaires que de toxicocinétique.

L'évaluation du danger que représentent de tels nanomatériaux nécessite de réaliser des études de toxicologie expérimentale par inhalation chez le rat de laboratoire qui constitue un modèle de choix pour l'extrapolation des résultats à l'homme. Un total de 841 rats mâles sera nécessaire à l'ensemble du projet. La compréhension des effets pulmonaires, cérébraux et systémiques des nanoparticules chez l'animal de laboratoire et chez l'homme est encore parcellaire et les études chez l'animal de laboratoire ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des cultures de cellules. Ce projet a donc deux objectifs :

Le premier est de comparer chez des rats jeunes (8 semaines) et âgés (16 mois) les effets toxicologiques observés au niveau pulmonaire et cérébral après inhalation d'un même aérosol de TiO₂ ;

Le second est de comparer chez des rats jeunes les effets pulmonaires et systémiques de deux aérosols obtenus à partir du même échantillon de TiO₂ mais ayant une distribution en taille différente (aérosol aggloméré vs. aérosol désaggloméré).

323- Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réponse fébrile ou des réactions de toxicité systémique.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir intégralement. En effet, aucune méthode alternative validée ne permet d'évaluer la pyrogénicité avec un large champ de détection (le test LAL permettant d'identifier uniquement la pyrogénicité véhiculée par des endotoxines) ou la toxicité systémique d'un produit en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (souris, cobayes) et de lapins. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex : pharmacopée européenne...). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 9000 lapins, 700 souris et 300 cobayes.

Tous les animaux bénéficient d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des essais.

Enfin, les animaux grégaires sont hébergés en groupe dès que possible ; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus dans tous les cas ; des chaînettes peuvent être suspendues aux cages des lapins pour qu'ils puissent se divertir ; et de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

324- La truite arc-en-ciel, première espèce d'élevage piscicole d'eau douce en Europe, est très largement affectée par un pathogène bactérien (*Flavobacterium psychrophilum*) lors des phases d'élevage précoces. Ces infections causent d'importantes mortalités et par conséquent, d'importantes pertes économiques pour la filière aquacole. Compte tenu des difficultés de contrôle de cet agent pathogène très résistant et en l'absence de programmes de vaccination efficaces (aucun vaccin sous AMM en UE), l'antibiothérapie par voie orale est une méthode très largement employée pour contrer les épizooties.

Le développement de l'aquaculture est en croissance positive et des efforts de recherche considérables sont mis en œuvre pour limiter l'utilisation d'antibiotiques par le développement d'aliments fonctionnels favorisant une meilleure résistance des animaux d'aquaculture aux facteurs biotiques et abiotiques.

Parmi les nombreux additifs présents sur le marché et revendiquant des propriétés immunostimulantes, prébiotiques ou probiotiques, les hydrolysats protéiques, ingrédients d'origine marine, représentent une solution d'avenir pour supporter une croissance durable de l'aquaculture. Leur richesse en peptides bioactifs (antimicrobiens, antioxydants, immuno-modulateurs...) et leur très haute valeur nutritionnelle pourraient permettre d'améliorer significativement le statut physiologique des animaux et, par conséquent, leur résistance aux pathogènes.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la performance immuno-modulatrice de deux hydrolysats d'origine marine chez la truite arc-en-ciel soumise à un challenge bactérien à *Flavobacterium psychrophilum*.

L'étude se déroulera en 2 phases. Une première phase consistera à nourrir (à la main et à satiété, 2 fois par jour) les poissons pendant deux mois (60 jours) avec des aliments (n=4) contenant ou non des hydrolysats. Ces aliments seront testés en triplica et chaque bassin comptera 50 poissons. Le nombre total d'animaux utilisé sera de 600.

Les poissons seront pesés toutes les 4 semaines pour quantifier le gain de poids et la performance d'utilisation de l'aliment. En fin de période croissance, la seconde phase consistera à infecter 80 poissons/lot par injection intramusculaire d'une souche de *Flavobacterium psychrophilum* tandis que 40 poissons/lot recevront un placebo. Soit $(80+40)*4=480$ poissons injectés au total. La survie des animaux sera suivie pendant 4 semaines et les groupes comparés. Ce suivi est associé à des prélèvements de matériel biologique opérés après sacrifice des animaux pour caractérisation au laboratoire.

325- La greffe rénale est le traitement de choix pour les patients atteints d'une insuffisance rénale terminale, tandis que les greffes hépatique ou cardiaque sont les seuls traitements qui permettront à sauver la vie des patients atteints d'une insuffisance hépatiques ou cardiaques. Un autre type de greffe, la greffe d'îlots pancréatiques est un nouveau traitement qui pourra améliorer la qualité de vie des patients diabétiques insulino-dépendants et diminuer les complications aiguës et chroniques du diabète. Grâce aux traitements immunosuppresseurs, la survie du greffon et des patients a été très améliorée durant les deux dernières décennies. Cependant, les complications liées aux traitements sont nombreuses et le rejet du greffon peut survenir dans plusieurs cas malgré ces traitements. Par conséquent, il est important de trouver de nouveaux immunosuppresseurs plus efficaces et moins toxiques.

Dans ce projet, nous allons étudier l'effet du blocage du récepteur d'une cytokine en transplantation d'organe en utilisant plusieurs modèles de greffe chez la souris. Cette cytokine est un facteur de croissance très important pour des lymphocytes, particulièrement des lymphocytes T mémoires. Comme les lymphocytes T mémoires jouent un rôle important dans le rejet du greffon, le blocage du récepteur de cette cytokine pourrait prolonger la survie du greffon et favoriser la tolérance.

Notre étude sur la greffe d'organe et de tissu nécessite des modèles *in vivo* car il n'existe aucun test *in vitro* pouvant les remplacer. Nous avons choisi de réaliser nos expériences chez la souris car nous avons l'anticorps monoclonal bloquant dirigé contre le récepteur de cette cytokine de la souris et ces modèles de greffes chez la souris sont bien établis dans notre laboratoire. Notre projet établi sur 3 ans nécessite une centaine de souris, ce qui est le nombre minimal nécessaire pour confirmer l'efficacité de cet anticorps bloquant sur 3 modèles de greffe différents et pour analyser les mécanismes d'action sous-jacents à ses effets thérapeutiques

326- L'unité de recherche étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe.

Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement des maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

L'objectif de ce projet est d'utiliser des rats KO pour les immunoglobulines de rat et qui ont été croisés avec des rats transgéniques exprimant de gènes d'immunoglobulines humaines (rats OMINRAT n=70 et rats CD contrôles n=30) et reconnaissant des antigènes définis afin de trier des lymphocytes B spécifiques d'un antigène donné, et ce, afin de séquencer les chaînes variables des Immunoglobulines de types G par PCR (single cell PCR).

En parallèle, nous effectuerons également ce type d'immunisation sur des rats immunodéficients KO IL2Rg KO x KO Rag 1 (n=5 + n=5 pour les contrôles).

L'identification des gènes exprimés par des cellules B antigène spécifiques permettra d'exprimer ces séquences et de générer des anticorps humains contre des antigènes définis.

327- L'unité de recherche étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe.

Un dysfonctionnement du système immunitaire peut provoquer la rupture de la tolérance au soi et être à l'origine du développement des maladies auto-immunes. Ainsi, la connaissance approfondie des mécanismes immunologiques impliqués dans la tolérance représente un enjeu capital pour améliorer à la fois la compréhension et le traitement des maladies auto-immunes.

Un des modèles que nous avons mis au point dans notre unité est le modèle de greffe de peau chez le rat. Ce modèle présente de nombreux avantages, notamment la survie du greffon est facile à suivre. Par rapport à d'autres modèles, nous pouvons profiter d'un seul donneur pour greffer 3-4 receveurs.

Le choix du rat repose essentiellement sur le fait que ces animaux présentent de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme que la souris et que les études fonctionnelles seront plus faciles à réaliser.

Nous allons donc utiliser ce modèle d'étude afin de mieux caractériser des rats KO pour les gènes Rag1 (n=5), IL2Rg (n=5) ainsi que des animaux issus du croisement entre ces 2 lignées (n=5), nous aurons également en parallèle de ces animaux des contrôles d'animaux littermates (n=15). Et pour compléter ce projet, nous utiliserons comme animaux donneurs des rats Lewis 1A (n=12)

328- La transplantation d'organe a énormément avancé ces quatre dernières décennies et représente le meilleur recours pour palier à des dysfonctionnements chroniques d'organes. Bien que les taux de survies à court terme soient bons, ceux à long terme restent faibles. Ceci peut être la conséquence d'un rejet chronique irréversible ou des effets secondaires des traitements immunosuppresseurs. Parvenir à une acceptation du greffon à long terme, sans traitement immunosuppresseur, et sans rejet chronique, constitue donc un but majeur, mais encore inaccessible, en transplantation d'organe en clinique. Le foie est un organe qui présente des caractéristiques immunologiques particulières qui se traduisent notamment par une fréquence élevée de patients transplantés devenant tolérants opérationnels, c'est à dire chez qui la greffe demeure même après arrêt du traitement immunosuppresseur. Cet état est particulièrement prévalent dans la transplantation hépatique, contrairement aux transplantations d'autres organes solides, pour lesquelles un traitement immunosuppresseur au long cours est presque toujours nécessaire pour éviter le rejet. Dans un travail très récent, le groupe du Dr A. Sanchez-Fueyo a entrepris d'étudier les signatures moléculaires associées à la tolérance à l'allogreffe hépatique, au niveau du greffon. Les greffes de patients tolérants expriment différenciellement une combinaison de gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer. Parmi eux, le gène de l'hepcidine, régulateur du métabolisme systémique du fer, est significativement surexprimé dans le greffon des patients tolérants par rapport aux non-tolérants. Le but de ce projet est d'étudier le rôle du métabolisme du fer dans la tolérance à la greffe allogénique. Pour cela le métabolisme du fer sera modulé soit par la teneur en fer du régime alimentaire, soit à l'aide d'un protocole de thérapie génique visant la modulation de l'expression de l'hepcidine. L'implication du métabolisme du fer sera évalué dans un modèle de greffe allogénique d'îlots pancréatique chez la souris.

Résumé du protocole:

Le but de ce protocole est d'étudier si la modulation du métabolisme du fer permet d'induire une survie prolongée d'îlots pancréatiques allogéniques. Pour cela:

- des souris C57BU6 rendues diabétiques par injection de streptozotocine seront placées sur un régime déficient, normal ou riche en Fer (n=66). Ces souris recevront ensuite une greffe allogénique d'îlots pancréatiques de souris Balb/c (n=72) ou une greffe syngénique d'îlots pancréatiques de souris C571B6 (n=72). La survie des îlots sera évaluée par mesure répétée de la glycémie. En absence de tout traitement, la greffe allogénique dans des conditions normale aboutit à une perte du greffon environ 20 jours post-greffe.

- des souris C57B116 recevront une injection de scAAV codant pour l'hepcidine (n=30) ou un soAAV codant pour différents shRNA ciblant l'hepcidine (n=90) ou un sh contrôle (n=30) ou du NaCl (n=30). Ces souris seront rendues diabétiques par injection de streptozotocine puis recevront ensuite une greffe allogénique d'îlots pancréatiques de souris Balb/c (n=108) ou une greffe syngénique d'îlots pancréatiques de souris C57/B6 (n=108). La survie des îlots sera évaluée par mesure répétée de la glycémie. En absence de tout traitement, la greffe allogénique dans des conditions normale aboutit à une perte du greffon environ 20 jours post-greffe.

329- 00700 Les céphalées constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. La migraine a été classée en tant que trouble d'origine neurovasculaire dont la prévalence globale dans les pays occidentaux est de 6 à 8% chez les hommes et de 15 à 25% chez les femmes. Les attaques de migraine sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. La céphalée migraineuse est souvent accompagnée de troubles digestifs incluant des nausées, des vomissements, et de troubles sensoriels tels que la photophobie et la phonophobie. Selon les études cliniques et précliniques, une inflammation méningée stérile associée à une sensibilisation du système trigémino-vasculaire sont considérées comme un élément clé aboutissant aux céphalées migraineuses. Cependant la nature et les mécanismes physiopathologiques qui

induisent l'activation de ce système trigémino-vasculaire restent controversés. Nous avons mis au point un modèle animal chez le rat qui rend compte des différents symptômes observés lors des crises migraineuses afin ensuite d'étudier les modifications neurobiologiques entraînées par une inflammation répétée des méninges.

Il arrive que la fréquence des crises migraineuses augmente au cours du temps, faisant ainsi évoluer la migraine dite épisodique en migraine chronique (plus de 15 jours de crises depuis plus de 3 mois). Lorsque cette fréquence augmente, un traitement de fond est proposé aux patients. L'un des plus efficaces est le propranolol, un antagoniste des récepteurs beta-adrénérgiques mais son mécanisme d'action reste mal compris.

Notre projet a pour objectif :

1. d'étudier l'effet du propranolol, sur les modifications comportementales, anatomiques et électrophysiologiques induites par l'inflammation des méninges,
2. de déterminer quelles sont les structures cérébrales impliquées dans l'effet du propranolol.

Pour ce projet, nous utiliserons 45 rats Sprague-Dawley dans 3 études différentes : comportementale, immunohistochimique et électrophysiologique. Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les rats utilisés dans l'étude comportementale seront ensuite étudiés dans l'étude immunohistochimique ou électrophysiologique.

Ce projet vient renforcer les connaissances scientifiques et médicales disponibles concernant la physiopathologie et la prise en charge thérapeutique des crises migraineuses. En effet, mieux comprendre le mécanisme d'action du propranolol nous permettra de trouver de nouvelles molécules qui auront une action plus ciblée de la pathologie migraineuse.

330- Le but de ce travail est d'évaluer la faisabilité et la fiabilité chez le porc, de l'anastomose par compression à l'aide d'un dispositif constitué d'anneaux fragmentables.

- 1) L'objectif principal est l'étude de la pression de rupture des anastomoses réalisées avec ces anneaux fragmentables par rapport à celles réalisées avec deux dispositifs de références déjà utilisés chez l'homme: des anneaux non fragmentables ou une agrafeuse circulaire.
- 2) Les objectifs secondaires sont la morbidité postopératoire (fistule et sténose digestive) et les résultats histologiques (inflammation, fibrose, tissu de granulation, alignement des couches, ré-épithélialisation).

331- Le vieillissement et la dégénérescence du cerveau associés à des déficits cognitifs et des symptômes neurologiques représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique, conduisant à de lourdes dépenses pour la société. La principale maladie dégénérative du cerveau, liée à l'âge, est la maladie d'Alzheimer (MA) avec environ 1 million de personnes en France atteintes et plus de 200.000 nouveaux cas chaque année. Une des caractéristiques pathologiques de la MA est l'apparition de plaques séniles composées d'agrégats du petit peptide β A4. Ce dernier fait partie d'une protéine précurseur de l'amyloïde plus grande (APP) qui est exprimée dans le cerveau. Les résultats récents de notre laboratoire indiquent qu'un site important de l'expression de l'APP dans le cerveau est le plexus choroïde, situé dans les ventricules. Dans une partie de notre projet de recherche, nous voulons déterminer si le plexus choroïde contribue à la sécrétion du β A4 toxique provoquant alors des plaques séniles dans le cerveau de souris atteinte de la MA, et de voir si en bloquant l'expression d'APP dans le plexus choroïde nous pouvons ralentir la neurodégénérescence du cerveau dans la MA chez la souris. En relation avec cette étude, des résultats récents d'autres laboratoires montrent que l'activité neuronale et les plaques de β A4 causent des dommages de l'ADN sous la forme de cassures doubles brins (CDB). Même si les cellules neuronales ont une machinerie de réparation de l'ADN, la réparation de CDB n'est pas parfaite et cela peut être une cause importante de la dégénérescence du cerveau. Compte tenu de notre longue expérience dans la rétine et le système visuel, nous examinerons la rétine dans notre modèle de souris MA et chez des souris traitées avec une excito-toxine, afin de détecter les CDB. Les résultats de cette étude sur la rétine, structure qui peut facilement être examinée, pourraient fournir un nouveau type de diagnostic précoce de la MA.

Nous travaillons également sur une deuxième maladie neurodégénérative, le glaucome, dans lequel les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) meurent conduisant à la cécité profonde et irréversible. En France, il y a environ 1 million de personnes atteintes de glaucome. Dans un travail publié précédemment, nous avons pu montrer que le facteur de transcription Otx2 de la famille des homéoprotéines peut augmenter la survie des RGC adultes abimées en culture cellulaire et après administration d'une excito-toxine in vivo. Nous voulons maintenant tester l'homéoprotéine exogène dans un modèle de souris largement utilisé dans glaucome impliquant une augmentation de la pression intraoculaire. Des résultats positifs seraient une preuve importante du concept, en vue d'un nouveau type de traitement du glaucome.

Le troisième volet de ce projet concerne la repousse des connexions nerveuses endommagées dans le cerveau. La capacité à stimuler la repousse des axones endommagés du nerf optique, ou les axones moteurs après lésion de la moelle épinière, ou encore les axones perdus après accident vasculaire cérébral est l'un des objectifs les plus importants en neurosciences. Jusqu'à présent, les résultats les plus importants sur des souris ont été obtenus en combinant des facteurs extrinsèques à des mutations transgéniques. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'administration d'une homéoprotéine stimule la repousse des fibres du nerf optique endommagé. Jusqu'à présent, les résultats sont meilleurs que ceux déjà publiés. Pour ce qui est du nerf optique, notre objectif est de déterminer si nous pouvons stimuler la repousse des axones endommagés et les guider jusqu'à leurs objectifs centraux, afin qu'ils puissent réformer des synapses fonctionnelles et restaurer la vision chez la souris.

En relation avec cette dernière partie, nous voudrions déterminer avec plus d'exactitude la mise en place des connexions synaptiques et comprendre comment les fibres nerveuses en croissance arrivent à déterminer où elles doivent s'arrêter dans le cerveau. Notre travail sur le développement du cerveau a montré comment les homéoprotéines contribuent à la précision de la formation des connexions nerveuses chez la grenouille et chez le poussin. Nous voudrions maintenant déterminer si les mêmes mécanismes contribuent au guidage axonal chez la souris. Ces résultats pourraient nous aider à comprendre certaines maladies d'origine neurodéveloppementale.

Ce projet demande donc l'utilisation d'animaux de laboratoire (souris) afin d'avoir des modèles des différentes pathologies étudiées, pour en déchiffrer les mécanismes et pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques chez l'Homme. Cependant, le nombre de ces animaux est réduit au minimum pour pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Afin d'attendre une puissance statistique de 0,6-0,8 (Button et al, 2013) nous utilisons le site www.statisticalsolutions.net/pss_calc.php pour calculer le nombre des animaux à utiliser. Nous estimons que notre projet nécessite l'utilisation d'environ 280 animaux par an.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

332- 00703 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative chronique qui touche 1 % de la population après 65 ans. On compte environ 100 000 malades en France, et 8 000 nouveaux cas se déclarent chaque année, un nombre qui est en augmentation.

La maladie de Parkinson touche des neurones dopaminergiques dans une région du cerveau profonde appelée "substance noire" qui dégénère progressivement. Ces neurones produisent la dopamine, un neurotransmetteur qui contrôle les mouvements automatiques du corps. L'objectif de nos études est de comprendre l'action d'une protéine propre à ces neurones, *Engrailed*, qui est essentielle à la survie de ces neurones et qui - ajoutée de l'extérieur - les protège dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson. Nous étudions donc au laboratoire l'intérêt d'*Engrailed* comme protéine thérapeutique dans la maladie de Parkinson pour a) protéger les neurones contre la dégénérescence et b) augmenter l'activité neuronale des neurones dopaminergiques. Nous utilisons des modèles de la maladie chez la souris pour comprendre l'action de cette protéine, ses effets protecteurs, mais aussi ses effets secondaires potentiels et les voies de signalisation impliquées. Ces modèles sont basés soit sur une toxine, soit sur une protéine mutée dans la maladie injectée ou infusée dans le cerveau, soit sur une souris transgénique qui ne possède qu'une copie du gène *Engrailed*. Ces modèles sont des modèles bien décrits, publiés et acceptés dans la communauté scientifique. Dans les deux premiers cas, les souris subissent une chirurgie sous anesthésie générale qui ne dure pas plus que 45min et exercée par un personnel spécifiquement formé. En postopératoire, les souris sont suivies quotidiennement par rapport à leur bien-être (douleur, comportement, perte de poids).

Nous faisons des tests comportementaux, nous déterminons le nombre de neurones dopaminergiques restants en présence ou absence d'*Engrailed* ainsi que des analyses sur des protéines, les ARN et ADN à partir des cerveaux de ces souris. Quand cela est possible, nous remplaçons les études sur les souris vivantes par des études sur cellules en culture. Nous avons mis au point des techniques permettant d'obtenir de l'ADN et des ARN à partir du même échantillon réduisant le nombre d'animaux nécessaire par deux. Nous avons estimé, avec l'aide des programmes statistiques, le nombre minimal d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats scientifiquement exploitables. Nous comptons utiliser 300 souris par an, soit 1500 souris sur la période considérée.

Notre but est de porter cette protéine dans un essai préclinique comme thérapeutique contre la mort des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson.

333- Ce projet a pour but de découvrir comment certains facteurs moléculaires contrôlent la plasticité et développement postnatale du cerveau. Des fenêtres d'opportunités de courte durée dites périodes critiques permettent au cerveau d'apprendre et de s'adapter à l'environnement. Nous avons identifié certaines homéoprotéines, des facteurs régulant l'expression de gènes, qui régulent l'ouverture et la fermeture de ces fenêtres. De plus, nous pensons que ces homéoprotéines peuvent réguler l'activité des cellules souches du cerveau. Mieux comprendre ces processus, certes importantes de point de vue recherche fondamentale, servira éventuellement à comprendre comment rendre un cerveau adulte plastique et capable de se régénérer.

Le modèle utilisé sera la souris *mus musculus*. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines.

Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à 1200 souris, dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique.

Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

334- Le protocole suivant concerne l'alimentation du chien. Il est réalisé dans le but de prouver l'adéquation entre l'exigence nutritionnelle de chiens adultes en phase de maintien et un régime inhabituel selon sa composition nutritive ou incorporation d'ingrédients tels que de nouvelles sources de protéines par exemple.

Le développement de formules spécifiques peut nécessiter le recours aux besoins nutritionnels minimum. Dans un tel cas, le protocole vérifie si le régime fournit le niveau approprié de substances nutritives disponibles car bien que les minima nutritionnels soient suivis, la disponibilité nutritive n'est pas toujours bien connue.

L'étude dure jusqu'à 26 semaines selon les besoins. Pendant l'étude, les chiens sont suivis cliniquement, pour leur poids corporel, la qualité de leurs selles et l'état du pelage ainsi que pour leurs paramètres sanguins (biochimie, hormones ...). Une mesure sera effectuée par semaine.

335- L'électromyostimulation est une technique utilisée en physiothérapie, dans la rééducation fonctionnelle post-traumatique et dans le cadre des préparations sportives.

Chez le Cheval, aucune étude objective ne permet de confirmer et mesurer l'impact quantitatif et qualitatif de ce traitement. Afin d'obtenir des indicateurs de l'effet de ce traitement sur la musculature du dos du cheval, un groupe de 8 chevaux, dont 4 seront des témoins, seront suivis pendant 6 semaines. L'électromyostimulation est très peu stressante et indolore. Le suivi clinique est composé de mesures échographiques et de biopsies de muscles sous anesthésie locale à l'aide d'aiguilles peu traumatiques.

Aucune autre manipulation n'est requise pour ce projet. Les résultats obtenus serviront à la médecine des chevaux, pour leur préparation sportive et pour la rééducation d'animaux affaiblis en phase de récupération.

336- Au cours du développement, les neurones établissent des connexions synaptiques, donnant lieu à un cerveau fonctionnel. Bien que la carte générale des connexions synaptiques est génétiquement préprogrammée, l'activité neuronale per se, qu'elle soit spontanée ou consécutive à une expérience sensorielle, joue un rôle primordial dans le câblage neuronal. Cependant, la question comment l'expérience sensorielle guide exactement les connexions des neurones reste largement inconnue. Nous dépendons largement de l'intégration de l'information provenant de nos sens (sensorielle) ou sa représentation cérébrale et de la genèse de mouvements appropriées (moteur). Nous allons donc tester l'hypothèse selon laquelle des signaux extérieurs induisent des patterns spécifiques d'activité neuronale dans le système sensori-moteur, guidant ainsi son développement. En outre, nous chercherons à identifier les perturbations des patterns physiologiques d'activité neuronale associées à des pathologies du système sensori-moteur, comme l'épilepsie et l'hypoxie-ischémie cérébrale aux âges précoces.

Pour tester nos hypothèses, nous allons utiliser les systèmes in vivo et ex vivo, une stratégie qui permettra une vision dynamique de l'activité neuronale au niveau des réseaux neuronaux et dans le contexte comportemental, ainsi qu'au niveau des neurones individuels. Notre approche de base in vivo consiste en l'enregistrement d'activité neuronale au sein du système sensorimoteur (au niveau cérébral et/ou de la moelle épinière) et du comportement, spontanée ou en fournissant des stimuli sensoriels, ainsi qu'en modifiant les entrées et les sorties appropriées au long des voies sensori-motrices. Nos expériences seront de nature aigue, d'où, les animaux seront euthanasiés immédiatement après les expériences in vivo ou, pour les expériences ex vivo, avant le prélèvement de tissu (le cerveau ou la moelle épinière). En utilisant cette stratégie nous pourrions montrer si durant les stades précoces de la vie, l'activité neuronale est induite de façon primaire par des signaux externes et sert exclusivement pour le développement cérébral. De plus, notre projet est d'une grande pertinence clinique avec des conséquences directes dans la compréhension et le diagnostic de l'épilepsie et de l'hypoxie-ischémie cérébrale néonatale.

Nombre et type d'animaux

Nous prévoyons l'utilisation d'environ 2760 rats et 1040 souris, âgés de 0 à 60 jours de vie.

Remplacement, réduction, raffinement

A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune alternative à l'utilisation de systèmes in vivo pour étudier des patterns d'activité neuronale par rapport au comportement, dans des états physiologiques et pathologiques, ou à l'utilisation de systèmes ex vivo pour une étude complémentaire de mécanismes de base au niveau de neurones individuels. Nous avons estimé le nombre minimal d'animaux nécessaires en utilisant des méthodes statistiques. Notre plateforme in vivo est compatible avec l'étude de multiples paramètres d'activité neuronale et de formes du comportement, quoique limitant l'utilisation de multiples procédures potentiellement douloureuses pour chaque animal.

Avant l'intervention expérimental, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies (placement de buchette de bois, dôme-home, nids-végétal ou tunnels dans les cages), et dans un environnement avec température, lumière et hygrométrie contrôlées (cycle 12 heures jour/ 12 heures nuit). Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

Au cours de l'expérimentation, les animaux seront maintenus à 37°C (rats) ou 38°C (souris) en utilisant un tapis chauffant. En outre, les animaux seront enveloppés dans un nid de coton précédemment placé dans la cage d'origine (odeurs), mimant ainsi la présence de la mère et/ou des frères/sœurs (contact). Nous allons contrôler non seulement de multiples paramètres

comportementaux, mais aussi physiologiques afin de prévenir les signes de douleur. Le comportement (y compris les mouvements des vibrisses, membres antérieurs et postérieurs ou l'activité musculaire) sera enregistré de façon non-invasive, en utilisant des transducteurs piézoélectriques et des caméras vidéo. Concernant les paramètres physiologiques, nous surveillerons la fréquence respiratoire (visuellement ou par transducteurs piézoélectriques) et le rythme cardiaque (utilisation d'électrodes en chlorure d'argent prégélifiées). Nous surveillerons aussi la piloérection (quand applicable), la position/posture de l'animal, la vocalisation, les réponses aux stimuli sensoriels (en particulier, le pincement des orteils) et le niveau d'hydratation (test cutané).

Pour toutes les procédures chirurgicales (craniotomie et laminectomie), une combinaison d'anesthésie (générale et locale) et d'analgésie sera utilisée. Un niveau approprié d'anesthésie sera vérifié par l'absence de secousses spontanées ou de réflexes/mouvements, une fréquence respiratoire dans des limites connues, l'absence de piloérection (quand applicable), l'absence de vocalisation et l'absence de réaction au pincement de l'orteil.

Pendant les enregistrements électrophysiologiques, les animaux seront sous analgésie seule ou sous analgésie et sédation. Dans ces conditions, les animaux peuvent montrer des secousses physiologiques et des réflexes. La fréquence respiratoire et le rythme cardiaque doivent être dans la fenêtre des valeurs physiologiques. Les animaux ne devront pas montrer de piloérection (quand applicable) ou de vocalisation. En cas d'un signe de douleur décrit ci-dessus, nous administrerons une dose supplémentaire d'analgésie ou analgésie et sédation.

337- Le projet vise à obtenir des modèles de diabète de type 2 afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules antidiabétiques. Ces modèles sont obtenus par induction (à différents stades de développement pour les 2 premiers) :

Alimentaire: régime spécifique

Chimique: injection de streptozotocine

Chirurgicale: ablation partielle du pancréas

L'ensemble de ces modèles vise à mimer les caractéristiques majeures du diabète de type 2 humain qui présente une anomalie de l'homéostasie glucidique, conséquence d'une résistance tissulaire à l'insuline, d'une diminution de la masse des cellules β du pancréas et d'un défaut de la réponse insulinoïque au glucose. Aucun modèle unique ne mimant l'intégralité de la pathologie humaine, il est nécessaire pour caractériser l'activité de nouvelles molécules sélectionnées au préalable sur des tests *in vitro* de les évaluer *in vivo* pour leur activité anti hyperglycémique dans différents modèles animaux (rats, souris) en fonction du mode d'action présumé de la molécule à tester. Les études sont effectuées selon la règle des 3R : nombre d'animaux minimum pour obtenir une significativité statistique satisfaisante, réutilisation des animaux selon les expériences (par exemple pour les tests de tolérance au glucose), utilisation des critères d'interruption, gestion de la douleur avec utilisation de protocoles expérimentaux adaptés.

338- La saisonnalité de la reproduction chez les Vertébrés représente une adaptation cruciale aux importantes variations annuelles de l'environnement (durée du jour, température, ressources alimentaires) et permet de grouper les naissances au printemps, lorsque les conditions de croissance et de survie sont favorables.

L'hormone T4 (thyroxine) produite par la glande thyroïde joue un rôle majeur dans la saisonnalité de la reproduction chez les oiseaux et les moutons. Chez le mouton, l'ablation de la glande thyroïde (thyroïdectomie) empêche l'arrêt de la saison de reproduction au printemps.

Ce projet a pour but d'approfondir considérablement notre compréhension de la suite d'événements par lesquels les hormones thyroïdiennes sont produites et agissent dans le cerveau pour contrôler le rythme saisonnier de reproduction chez la brebis de race Ile-de-France. Le projet examinera précisément où et quand certains gènes-clé impliqués dans ce processus sont activés ou réprimés dans une petite région du cerveau, l'hypothalamus. L'évaluation précise du rôle des hormones thyroïdiennes sera possible grâce à la mise en œuvre d'une approche chirurgicale de thyroïdectomie.

Puisqu'il s'agit d'un phénomène saisonnier, il est indispensable de l'étudier à différents moments de l'année (notamment lorsque les animaux sont sexuellement actifs ou au repos sexuel), et donc de répéter l'approche, ce qui justifie le nombre de 48 brebis.

Chacune des 3 expériences comprend un groupe contrôle et un groupe thyroïdectomisé avec chacun 8 animaux, nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiques valides à l'issue du projet. La chirurgie, effectuée par un vétérinaire, nécessitera une mise au point préalable (évolution clinique des animaux après la chirurgie et traitements, mise au point des dosages hormonaux); un groupe supplémentaire de 8 animaux est prévu à cet effet (nombre total d'animaux pour ce projet = 56). Ce modèle étant supposé invalidant, nous prévoyons un hébergement en cages spacieuses où les animaux seront avec des congénères, avec foin et paille de qualité à volonté; la durée des procédures a été limitée à son strict minimum. La surveillance sera biquotidienne.

La reproduction saisonnée est par essence un mécanisme physiologique intégré extrêmement complexe qui ne peut être étudié que par une approche *in vivo*. Bien que les hamsters soient couramment employés dans ce domaine de recherche, leur petite taille exclut des prélèvements sanguins réguliers (bihebdomadaires pour ce projet), indispensables pour évaluer l'état reproducteur des animaux.

Les mécanismes généraux de la reproduction saisonnée étant conservés chez les Vertébrés, la portée des résultats ira bien au-delà du modèle ovin. Une meilleure compréhension des mécanismes de la reproduction saisonnée pourrait déboucher sur un meilleur contrôle de la conduite des élevages ovins : l'objectif final est d'optimiser le désaisonnement des animaux pour permettre l'étalement des naissances dans l'année et donc assurer une meilleure compétitivité des éleveurs ovins français dans un contexte très concurrentiel.

339- Nos études précédentes ont montré qu'un médiateur inflammatoire, la chimiokine RANTES/CCL5 induisait la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé angiogenèse. Le but de ces travaux est d'étudier chez la souris le rôle joué par un des récepteurs de RANTES/CCL5, le syndécanne-4 (SDC-4), dans les effets angiogéniques de cette chimiokine. L'optimisation de la délivrance locale de la chimiokine RANTES/CCL5 peut être réalisée par l'implantation sous-cutanée d'un biomatériau sous forme de pastille permettant la rétention et la délivrance progressive de la chimiokine dans le tissu environnant. Cette pastille peut également permettre de libérer des cellules endothéliales. Ainsi, l'induction de l'angiogenèse sera étudiée dans un modèle de souris nude immunodéprimée, 7 jours après l'implantation de pastilles contenant des cellules endothéliales humaines que l'on a modifiées pour les faire exprimer différents types de SDC-4 humain, incubées ou non avec la chimiokine RANTES/CCL5. Seules ces souris immunodéprimées ne développeront pas de réaction immunitaire de rejet suite à l'introduction de cellules humaines. Nous avons cherché à réduire au minimum possible le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Pour cela, nous avons appliqué un test de puissance statistique nous permettant de calculer le nombre minimal d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables (100 souris par an soit 300 souris au total sur une durée de 3 ans). Le choix des animaux utilisés a été effectué sur le modèle animal homéotherme le plus petit (souris) ayant des caractéristiques de vascularisation proche de l'homme. A l'aide des résultats préliminaires obtenus, nous avons défini le temps minimal de la procédure expérimentale, égale à une semaine, nécessaire à la formation de vaisseaux sanguins après implantation des biomatériaux, nous permettant d'établir un protocole d'étude à court terme. L'effet angiogénique de RANTES/CCL5 sera comparé après expression par les cellules endothéliales humaines contenant un plasmide vide, un plasmide codant pour le SDC-4 humain, un plasmide codant pour un SDC-4 muté S179A qui accroît la formation de réseaux vasculaires par des cellules en culture, ou un plasmide codant pour un SDC-4 muté L188QQ, qui réduit fortement la formation de réseaux vasculaires par des cellules en culture induites par RANTES/CCL5.

340- L'immunothérapie spécifique d'antigène de tumeur constitue une approche thérapeutique, complémentaire des traitements classiques en oncologie que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans ce cadre, un produit d'immunothérapie, ciblant un antigène exprimé par des tumeurs (MUC1), a été généré.

Il vise à induire des réponses immunitaires spécifiques de cellules tumorales et à stimuler les défenses naturelles de l'organisme. Le but du projet est la mise au point d'un test (tétramères) permettant de mettre en évidence l'activation des lymphocytes T chez les patients traités par immunothérapie.

L'utilisation des tétramères pour identifier la réponse T spécifique est difficile en clinique en partie à cause de l'hétérogénéité du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) dans la population humaine. A cette fin, des lignées de souris transgéniques pour chacune des 9 molécules du CMH les plus représentées dans l'humanité (A01.3, A2.01, A24.2, 807.2, 808.1, 827.5, 835.1, 844.2 and C7.1), couvrant ainsi plus de 80 % de tous les groupes ethniques, ont été générées. Le traitement de ces souris avec l'antigène MUC1 (immunisation) permettra l'identification des peptides restreints par chacune de ces molécules du CMH. Les tétramères pourront ensuite être synthétisés et leur capacité à reconnaître des lymphocytes T spécifiques des peptides étudiés pourra être vérifiées avec ces animaux. Les tétramères ainsi générés pourront être utilisés dans le suivi des patients recevant un traitement d'immunothérapie spécifique de l'antigène MUC1 pour leur cancer. Un nombre maximal de 630 animaux est envisagé pour ce projet. L'emploi d'animaux s'impose du fait de l'absence de méthode substitutive in vitro pour générer des réponses immunitaires.

341- Les maladies psychiatriques (schizophrénie, dépression) sont caractérisées par des dysfonctionnements localisés au niveau de certaines régions cérébrales impliquées dans les processus cognitifs et émotionnels. C'est ce dysfonctionnement que nous cherchons à modéliser chez l'animal avec comme objectif la recherche de thérapeutiques capables de corriger ces dysfonctionnements.

Des données épidémiologiques suggèrent que les gènes présents dans les régions chromosomiques 22q11 et 15q13 seraient de bons candidats pour conférer un risque de vulnérabilité génétique à la schizophrénie. La haute fréquence de troubles psychotiques dans le syndrome de délétion 22q11et 15q13 renforce l'implication de gènes présents dans la région déléetée. Certains de ces gènes ont été identifiés et leur rôle étudié grâce à la création de modèles murins. Nous disposons de deux modèles de souris porteuse de mutations de gènes dans chacune de ces régions chromosomiques 22q11 et 15q13.

Dans le but de comprendre comment une telle mutation conduit à un phénotype donné, nous étudierons ces modèles génétiques avec des approches anatomiques, comportementales et fonctionnelles pour caractériser leur phénotype. Nous prévoyons d'utiliser 760 animaux sur 5 ans. Un tel effectif est nécessaire afin de parer aux incertitudes expérimentales, et de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes dans chacune des procédures expérimentales utilisées.

Notre objectif est d'identifier des caractéristiques (1) anatomiques (terminaisons axonales, neurotransmetteur, dendrites) (2) comportementales et cognitives (mémoire à court et long terme) (3) fonctionnelles (activité et plasticité neuronale) dans les régions du cerveau où convergent les informations cognitives et émotionnelles.

Par ailleurs, une meilleure compréhension des interactions entre facteurs génétiques et environnementaux est nécessaire pour améliorer le traitement des troubles psychiatriques. Les situations de stress étant des facteurs susceptibles de précipiter l'apparition de ces troubles, nous testerons la réponse au stress chez ces souris mutantes. Les effets du stress seront explorés sur le plan fonctionnel.

Enfin, ces mêmes expériences seront réalisées avant et après administration de substances pharmacologiques et/ou de nouvelles molécules supposées prévenir et/ou limiter les effets du stress.

342- La polykystose rénale humaine (PKD) est une maladie génétique caractérisée par la formation de kystes conduisant à une insuffisance rénale terminale. Il n'existe pas jusqu'à présent de traitement préventif ou curatif efficace. Deux gènes, PKD1 et PKD2 sont en grande partie responsables du développement de la maladie, mais d'autres gènes sont également impliqués. Nous avons montré que la mutation d'Anks6 provoque la formation de kystes dans le rein. Nous savons que cette protéine est capable de se lier à de nombreux partenaires et notre objectif est d'évaluer le rôle de ces protéines partenaires sur la formation de kystes dans le rein. Pour cela, nous regarderons si la perte d'expression de chacune de ces protéines provoque la formation de kystes chez la souris. Nous utiliserons tout d'abord des cultures cellulaires pour développer le projet puis nous compléterons et validerons les résultats en utilisant des souris. Nous serons attentifs à utiliser un nombre minimal de souris (240 animaux maximum) qui sont manipulées et maintenues dans des conditions d'hébergement répondant à la réglementation

343- La recherche sur le mélanome est un axe prioritaire de l'IGR et l'interaction dans ce domaine avec la clinique est très forte. Le modèle de mélanome spontané qui sera utilisé est pertinent pour les questions soulevées. Le projet s'articule autour de la mise en évidence de l'immunogénicité de mélanomes spontanés produits dans la souris (Tyr: :NRas et β -caténine^{sta}) pertinent pour l'étude du mélanome humain. Nous nous proposons d'identifier les effecteurs anti-tumoraux spécifiques afin de voir la présence d'une infiltration immunitaire à l'aide d'immunomarquage sur cryosections (CD4, CD8, CD119, F4/80, CD11b, Ly6G, Gr1). Le modèle de mélanome spontané est un modèle approprié pour le développement d'une recherche préclinique qui est en panne de modèle adapté.

344- Depuis plus de 40 ans, le traitement des pathologies cancéreuses, aujourd'hui devenues première cause de mortalité en France, s'appuie sur quatre modalités principales, la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Le mécanisme d'action supposé de la plupart de ces traitements résulte d'une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales. Le rôle du système immunitaire dans le développement et la « sélection » de cellules tumorales, maintenant clairement établi, amène à reconsidérer l'idée que le cancer n'est qu'une maladie de tissus ou d'organes, pour le concevoir également comme une maladie de l'hôte. Cette théorie est renforcée par des travaux scientifiques récents montrant que certaines chimiothérapies peuvent générer une réponse immunitaire liée à l'induction d'une mort cellulaire immunogène. En effet la mort cellulaire induite par les thérapies anticancéreuses conduit à la libération de signaux de danger provenant des cellules tumorales qui vont activer le système immunitaire de l'hôte contre sa tumeur. Ainsi les succès constatés après une chimiothérapie ou une radiothérapie seraient conditionnés à une synergie entre des effets cytotoxiques directs des thérapies anticancéreuses au niveau du tissu tumoral et des effets indirects spécifiques et à long terme dus à la réponse immunitaire de l'hôte. Certains agents anticancéreux peuvent induire la mort cellulaire immunogène qui va mener à une réponse immunitaire spécifique contre les tumeurs. L'interleukine 10 (IL10) est une protéine produite par différentes cellules sanguines et agissant en diminuant la réponse immunitaire. L'IL10 inhibe la production de certaines cytokines, comme l'IL2, l'IL3, le tumor necrosis factor et certains interférons. Récemment, nous avons montré que l'IL10 est super-exprimée dans les cellules présentatrices d'antigène (CPA) intra-tumorales après le traitement avec certains agents anticancéreux qui, comme la doxorubicine, peuvent induire la mort cellulaire immunogène in vivo. Nous souhaiterons continuer cette étude sur le rôle de l'IL10 dans la modulation de la mort cellulaire immunogène en utilisant des souris C57Bl/6 (n. 530) et aussi les souris transgéniques C57Bl/6 IL10-GFP (n.80), maintenant accessible dans le commerce. Ces souris présentent un phénotype complètement normal, mais elles produisent l'IL10 fluorescente en vert, ce qui nous permettra de suivre la « vie » de cette protéine in vivo. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la mort cellulaire immunogène et la réponse immunitaire aux cancers dans le but d'arriver à contraster les tumeurs résistantes à tous traitements.

345- Le projet a pour objectif d'augmenter nos connaissances sur les mécanismes d'adressage des récepteurs de la sérotonine, de certains récepteurs orphelins (GPR88) en incluant également des expériences sur des enzymes de synthèse de neurotransmetteurs (GLS 1). Ces molécules sont ou peuvent constituer de nouvelles cibles pharmacologiques. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cérébrales et leurs mécanismes de routage et de trafic ainsi que la régulation de ces mécanismes par des traitements pharmacologiques sont peu connus. Le projet permettra de mieux comprendre ces mécanismes dans le but d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques. Dans ce projet, nous utiliserons des modèles

rongeurs (rats et souris de lignées commerciales, transgéniques ou KO générées par notre équipe) pour effectuer des expériences de comportements qui modèlent certains traits pathologiques chez l'homme après injections ou non de molécules ayant un effet pharmacologique, ou après lésions de certaines régions du cerveau ou sous-populations neuronales. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sur 5 ans sera de 716 animaux: 506 souris et 210 rats.

346- Le projet a pour objectif d'augmenter nos connaissances sur le rôle de la neurotransmission sérotoninergique et glutamatergique, en particulier la biosynthèse des neuromédiateurs et le trafic de leurs cibles, les récepteurs, en condition physiologique, pathologique et après des traitements médicamenteux au long cours. Ces neurotransmissions sont essentielles au fonctionnement du cerveau et leurs dysfonctionnements ont été mis en évidence dans des pathologies psychiatriques (anxiété, dépression), et dans des déficits de la mémoire et déficits cognitifs. Les cibles des médicaments appartiennent à différentes classes de molécules, les récepteurs ou les transporteurs aux neurotransmetteurs, mais aussi les enzymes de synthèse ou des régulateurs de voies de trafic de molécules ou signalisation moléculaire. Ainsi, la connaissance des mécanismes d'action des médicaments sur ces cibles, mais aussi la régulation physiologique ou après des traitements thérapeutiques longs est essentielle au développement de nouveaux médicaments. Dans ce contexte, nous nous intéressons plus particulièrement aux antidépresseurs et aux conséquences de traitements pharmacologiques longs puisque les patients sont souvent traités sur des périodes qui peuvent durer plusieurs années et peuvent connaître au cours de leur vie plusieurs épisodes pathologiques. Nous nous focalisons en particulier sur les récepteurs de la sérotonine (5-HT_{1A}, 5-HT₃) et leur protéines partenaires (protéine Yif1B, récepteurs P2X) ainsi que sur la synthèse de glutamate (enzyme glutaminase). Dans ce projet, toutes les expériences qui ne nécessitent pas d'utiliser des animaux seront réalisées sur des systèmes cellulaires, cependant, des investigations de biochimie, de biologie cellulaire et de pharmacologie sur des prélèvements ex vivo d'animaux après euthanasie seront essentielles pour modéliser ce qui se passe chez l'homme ; nous utiliserons des modèles murins (rats et souris de lignées commerciales, transgéniques ou KO). Enfin, nous réaliserons sur ces modèles murins des expériences de comportements qui modèlent certains traits pathologiques chez l'homme après injections ou non de molécules ayant un effet pharmacologique (notamment anxiolytiques et antidépresseurs utilisés en clinique chez l'homme). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sur 5 ans sera de 1370 souris et 700 rats soit 2070 animaux sur la durée du projet

347- Dans le cadre de la 3^{ème} année Licence Science, Technologies, Santé mention Biologie parcours Nutrition, l'objectif des travaux pratiques (TP) de l'unité d'enseignement «Nutrition et Métabolisme» est l'exploration des désordres métaboliques dans un modèle expérimental. Le modèle animal retenu sera le rat. Un lot de 10 rats sera soumis à une variation nutritionnelle et sera comparé à un lot de 10 rats contrôle. Ce nombre réduit au sein de chaque lot selon le nombre d'étudiants inscrits au module. En effet, un binôme aura en charge un animal. Les étudiants réaliseront un certain nombre de tâches: suivi des animaux, euthanasie, recueil et traitements des prélèvements, analyses statistiques des résultats, rédaction d'une publication et présentation orale

348- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables. Le risque d'effets graves et irréversibles, tel qu'un effet génotoxique, est une préoccupation importante et il est indispensable que ce risque soit réduit autant que possible.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier un tel risque pour pouvoir le réduire au minimum avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir. Si des méthodes alternatives permettent d'identifier certains risques génotoxiques, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble d'entre eux, étant donné la complexité des mécanismes impliqués in vivo (par exemple, en raison de la pharmacocinétique du produit, c'est-à-dire son devenir dans l'organisme). Les essais in vivo sont donc généralement requis en complément des études in vitro.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener: il s'agit dans ce projet de souris. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes pris pour référence (lignes directrices de l'OCDE). Par an, jusqu'à 750 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de lui assurer un bien-être optimal tout au long des procédures. Lorsque les interventions sont susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures sont envisagées (par exemple, anesthésie et analgésie des animaux au préalable). Enfin, les souris étant des animaux grégaires, elles sont hébergées en groupes. Un bedding (copeaux) est déposé sur le sol pour enrichir le milieu (par exemple, construction de nids possible) et de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement

349- La bronchite infectieuse est une maladie virale de distribution mondiale, très fréquente et très contagieuse. Elle entraîne de grandes pertes dans la production d'œufs et le gain de poids, et peut aussi provoquer des saisies à l'abattoir.

Il existe une vaccination efficace basée sur des vaccins à virus vivant atténué, administrables par voie oculaire (pas entre 6 et 10 jours), par nébulisation, ou dans l'eau de boisson.

La présente demande d'autorisation de projet concerne le test de tolérance préalable à la mise sur le marché de deux lots d'un vaccin connu pour son efficacité vis-à-vis de la bronchite infectieuse aviaire.

Cette étude est donc réalisée dans le cadre de la procédure d'octroi de l'AMM, son déroulement est par conséquent fixé dans la pharmacopée européenne.

Pour chaque lot de vaccin testé 15 poulets de 7 jours vont être vaccinés par voie orale avec une dose standardisée de vaccin. Ces lots vaccinés seront comparés en termes de signes cliniques, prise de poids et séroconversion à un lot contrôle ne recevant que de l'eau stérile.

350- Le but général de ce projet est de contribuer au développement de thérapies anti-tumorales innovantes et notamment de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer colorectal humain. Ces processus pathologiques ne peuvent être étudiés correctement *ex vivo* car il s'agit de phénomènes complexes. La souris est utilisée comme modèle car les phases biologiques, moléculaires et cliniques de la tumorigenèse du colon sont semblables aux phases observées chez l'humain. Ce modèle permettra notamment le développement de nouveaux marqueurs de diagnostic ou de nouveaux axes thérapeutiques. Pour ces projets, 113 souris par an seront utilisées afin d'étudier ce type de cancer à différents stades de son développement notamment en produisant des produits biologiques analysables ensuite par différentes techniques histologiques, histochimiques, ou avec différents outils moléculaire ou cellulaire. Le nombre d'animaux a été déterminé pour obtenir des résultats statistiquement exploitables, sur la base d'études réalisées précédemment.

351- Les dystrophies rétiniennes héréditaires (DRH) sont des maladies neurodégénératives de la rétine dont la prévalence dans la population générale est d'environ 1 cas pour 4000 personnes.

Les DRH regroupent notamment les rétinites pigmentaires et les amauroses congénitales de Leber dont les gènes mutés impactent la fonction des photorécepteurs et/ou de l'épithélium pigmentaire rétinien. L'altération de la fonction de ces cellules entraîne chez l'individu une perte des fonctions visuelles pouvant aboutir à la cécité. La perte de fonction s'accompagne d'une dégénérescence des photorécepteurs (bâtonnets et/ou cônes), mais aussi d'une altération des cellules situées en aval du transit de l'information électrique (comme les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires rétiniennes dont l'axone forme le nerf optique).

Nous travaillons chez 3 modèles canins de DRH :

- le chien Briard Rpe65^{-/-}, un modèle canin naturel d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène Rpe65 qui code une enzyme exprimée au niveau des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

- Le chien mini teckel à poil long Rpgr1^{-/-}, un modèle canin naturel d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène Rpgr1 qui code une protéine exprimée au niveau du corps ciliaire des photorécepteurs cônes et bâtonnets.

- Le chien Setter Irlandais Pde6β^{-/-}, un modèle canin naturel de rétinite pigmentaire liée à un défaut en Pde6β qui code une enzyme exprimée dans la partie photosensible des photorécepteurs bâtonnets.

Le modèle canin est un très bon modèle préclinique pour l'évaluation de traitement par thérapie génique des DRH car la dégénérescence rétinienne chez le chien est très proche de celle observée chez l'homme. De plus, la taille et l'anatomie de l'œil du chien sont très proches de celles de l'homme.

Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter les DRH. La thérapie génique d'addition, qui consiste en l'apport d'une copie supplémentaire des gènes mutés au sein des cellules rétiniennes déficientes, est une approche thérapeutique intéressante. A ce jour, nous avons testé plusieurs vecteurs thérapeutiques chez les 3 modèles canins de DRH. Les résultats précliniques obtenus sur les 3 modèles ont montré que le transfert de gènes pouvait permettre de restaurer la fonction des photorécepteurs et de restaurer au long terme la vision des chiens.

Ces résultats précliniques ont permis le démarrage d'un essai clinique de phase I-II chez 9 patients Rpe65-déficient). Les premiers résultats cliniques sont très encourageants.

Nous souhaitons maintenant analyser l'état cellulaire des zones rétiniennes traitées et non traitées chez les 3 modèles canins de DRH (n=3 par groupe) et les comparer aux rétines saines de chiens hétérozygotes (n=3 par groupe). L'objectif principal est d'identifier les types et fonctions cellulaires rétiniennes sauvegardées après transfert de gènes dans des 3 modèles de DRH. Les résultats de cette étude nous permettront d'une part de mieux comprendre les effets thérapeutiques après transfert de gènes chez l'homme et d'autre part d'améliorer les futurs essais cliniques.

352- Dans 10 % des cas, la myocardite aiguë évolue chez l'homme vers une myocardite chronique et vers une cardiomyopathie dilatée (CMD), qui est la première cause de transplantation cardiaque dans les pays développés
Objectifs : (i) Démontrer dans un modèle de myocardite à EV chez la souris immunocompétente que la persistance virale est associée à un profil immunologique Th2 et notamment à une sécrétion plus importante d'IL-10, (ii) Vérifier que l'IL-10 pourrait être un biomarqueur d'évolutivité de la CMD.

Stratégie scientifique: Bien qu'immunocompétentes, les souris C3He/J ne parviennent pas à éliminer dans 100% des cas l'EV cardiovirulent qu'on leur a inoculé. En cas de persistance virale, après 14 jours post-inoculation, on ne retrouve plus de particules virales mais uniquement de l'ARN viral et ce, jusque 150 jours post inoculation. Les souris NMRI semblent exprimer davantage d'IL-10 que les souris C3He/J après inoculation. La technologie Luminex® permettrait un dosage sensible des cytokines Th1 et Th2 dans le plasma des souris C3He/J âgées de 7 semaines, après inoculation de la souche EV cardiovirulente Cocksackie virus B3 Nancy délétée (n=6) ou non (n=6), comparativement à des souris C3He/J témoin (mock-infected) (n=3) et comparativement à des souris NMRI (n=15). Les

dosages plasmatiques seront répétés en phase aiguë (myocardite aiguë) (J3, J7, J14 post inoculation) et en phase chronique (myocardite chronique et CMD) (J21, J28, J60, J90).

Les nouvelles méthodes de tomographie par fluorescence permettront de dépister à partir de J15 les souris porteuses de CMD. La persistance de l'ARN viral au niveau cardiaque sera confirmée par biologie moléculaire après euthanasie finale de l'animal.

Les dosages plasmatiques en phase aiguë permettront de corroborer éventuellement l'hypothèse que le profil Th2 est associé à une persistance virale, tandis que les dosages en phase tardive permettront de voir si la persistance du seul ARN viral est associée à une détection périphérique d'IL-10. Dans cette hypothèse, une corrélation sera recherchée entre les anomalies évocatrices de CMD à l'imagerie comme à l'histologie et les dosages d'IL10.

353- 1. Dans un premier protocole, nous avons montré que la présence d'un mélange de 4 polluants (2 persistants et deux non-persistants) dans une alimentation riche en gras proposée toute au long de la vie, provoquait dans la descendance de 1ère génération (F1) des désordres métaboliques différents selon le sexe, Les objectifs de ce nouveau projet sont: (1) de définir si ces effets sont retrouvés dans le contexte d'une alimentation standard, (2) d'explorer les mécanismes (en particulier marques épigénétiques) impliqués dans l'adaptation à une exposition aux polluants (réversibilité ou non des effets) ainsi que les effets éventuels sur des générations non-exposées (effets trans-générationnels sur 3ème génération, F3, après basculement de la F1 au moment du sevrage, sur un régime standard sans polluants),

2. Le but du modèle décrit ci-dessus, de souris exposées toute la vie (donc en partie via les mères) ou pendant des fenêtres précises, à des polluants en mélange à doses faibles via l'alimentation est d'utiliser des modes d'exposition au plus près de la réalité en santé humaine. Selon les résultats, le message en matière de politique de prévention de Santé Publique pourrait cibler ou non des populations définies (ex: en surpoids ou obèses, femmes enceintes",),

3. Dans le cadre de cette étude sur l'animal, nous essayons de limiter au maximum et dans la mesure du possible, le nombre d'animaux utilisés, Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux expérimentés est ajusté sur la base d'une portée moyenne de 6 avec un nombre minimal de 2 mâles ou 2 femelles par portée de sorte à avoir un nombre d'échantillons permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables, Par ailleurs, les travaux nécessitant des études multiples, telles que les effets-doses et les interactions entre polluants, seront réalisés sur cellules en culture,

4. Pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, nous tablons sur un nombre de 10 animaux par groupe défini. Sachant que nous étudions les descendants de 1ère génération des deux sexes (276 animaux/5ans) ainsi que les effets transgénérationnels sur la 3ème génération non exposée (160 animaux/5 ans), nous utiliserons environ 436 animaux sur les 5 ans, toutes générations confondues.

354- Ce projet a pour objectif d'assurer la fourniture des produits biologiques, d'origine animale, nécessaires à la réalisation des tests de contrôle qualité assurant la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité et d'activité. Les produits biologiques (globules rouges, anticorps polyclonaux) sont nécessaires pour la mise en œuvre de tests in vitro; à ce jour, ils ne peuvent pas toujours être produits sans le recours à l'animal de laboratoire. Les tests de contrôle qualité sont des tests réglementaires pour les vaccins commercialisés et pour les produits en développement.

Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 1500 cobayes, 2000 lapins et 100 furets sur une période de 5 ans.

Les protocoles encadrant la collecte de sang ou l'immunisation d'animaux avec des mélanges d'antigènes et d'adjuvants n'entraînant pas de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux. Dans le cas où les animaux présenteraient des lésions cutanées des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une perte d'état général ou une maladie sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire.

Pour les cobayes il s'agit d'un geste technique sous anesthésie, sans réveil de l'animal.

Pour l'immunisation des lapins, la nature du mélange antigène et adjuvant utilisé est susceptible d'entraîner des réactions de type allergique ou des réactions locales aux sites d'injection. Le degré de sévérité est considéré comme modéré et pouvant aller jusqu'à sévère pour une faible proportion de lapins (15%). Pour les furets, le degré de sévérité est léger.

L'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'éthique et la Structure de Bien-être Animal.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement:

Les produits d'origines animales sont utilisés uniquement lorsque des produits fabriqués in vitro (anticorps monoclonaux) ne sont pas disponibles ou adaptés à l'utilisation visée. Le sang (globules rouges) est obligatoirement issu d'animaux en parfaite santé.

Réduction:

Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de tests sur la période (quantité de réactifs). Ce calcul tient compte des durées de péremption des produits mais aussi des évolutions technologiques pour les tests considérés et des perspectives de marché pour les vaccins produits.

Raffinement:

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (abris, surfaces de repos) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires.

355- L'appareil sphinctérien du canal anal, composé d'un muscle strié appelé sphincter anal externe, joue un rôle déterminant dans la continence anale. Cet organe peut être lésé en cas de traumatisme obstétrical suite à un accouchement ou à une chirurgie anorectale. Les conséquences de ces lésions sont un risque d'incontinence anal aux selles ou aux gaz non négligeable (chez 45 à 95% des patientes avec un risque d'incontinence anal variant de 5 à 57%). La réparation chirurgicale de ces lésions, appelée sphinctéroplastie, ne donne que 40 à 45% de bons résultats à long terme (évaluation 10 ans après la chirurgie). Ces séquelles fonctionnelles ont un impact négatif sur la qualité de vie des patients et peuvent être responsable d'une détresse psychosociale importante.

Cette étude consistera en (i) une mise en place d'une nouvelle prothèse tissulaire composée de cellules musculaires humaines et d'une matrice de collagène et (ii) une évaluation thérapeutique de ce nouveau patch sur un modèle de défaut-sphinctérien chez le rat nude.

Notre étude permettra de mieux préciser l'intérêt thérapeutique de ce nouveau patch sur la réparation tissulaire, le modelage du sphincter et la fonction du sphincter et la fonction du sphincter anal externe.

356- La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui affecte 120 000 personnes en France. Des souches de *Escherichia coli* Adhérents et Invasifs (AIEC) ont été retrouvées au niveau iléal chez 36,4% des patients atteints de MC et chez seulement 6% des contrôles. Les bactéries AIEC sont capables d'adhérer à la muqueuse iléale via le récepteur CEACAM6 anormalement exprimé chez les patients. La colonisation intestinale par les AIEC peut être mimée en modèle de souris transgénique exprimant CEACAM6 et provoque des signes de colite. L'interaction AIEC/CEACAM6 fait intervenir l'adhésine FimH des pili de type 1 des bactéries qui reconnaît des résidus mannoses de CEACAM6. Des travaux menés en collaboration avec des équipes de chimistes (projet ANR Blanc Starlet) ont permis d'élaborer des composés possédant des ligands mannosylés pour bloquer FimH. Les composés, de structures hétérogènes (cyclique, linéaire ou en étoile) possèdent des valences en ligands mannoses variables. Ils ont été étudiés *in vitro* pour leurs propriétés inhibitrices de l'adhésion des souches AIEC aux cellules épithéliales intestinales. Neuf composés ont été sélectionnés lors de ce criblage : deux composés linéaires, deux polymères étoilés à 3-bras, deux polymères étoilés à 8-bras, deux composés cyclodextrines de valence 1 et 7 et un composé monovalent. Ils seront analysés dans le modèle de souris CEABAC10 infecté par la souche AIEC de référence LF82 afin d'évaluer leur capacité à diminuer la colonisation bactérienne intestinale. La sévérité de la diarrhée, les signes de colite et l'inflammation intestinale seront également suivis. Il s'agit d'analyser si les composés conservent leurs propriétés anti-adhésives observées *in vitro*, suite à leur administration orale et d'analyser si la diminution de la colonisation est accompagnée d'une amélioration de la colite. L'heptyl-mannose (HM) sera ajouté à l'étude en tant que molécule de référence. HM est un puissant inhibiteur de FimH qui prévient l'adhésion et la formation de biofilm des *Escherichia coli* urinaires à la surface de la vessie. Enfin, il faut prévoir un lot de souris infectées /non traitées et un lot de souris non infectées /non traitées en tant que contrôles. Chaque lot de souris comprendra 10 animaux ce qui représente 120 animaux transgéniques au total.

La 2ème partie du projet consiste à tester les 3 composés ayant obtenu les meilleures propriétés anti-adhésives dans la 1ère partie expérimentale, à 3 doses différentes afin d'analyser l'effet-dose et de déterminer la dose minimale pour conserver les effets bénéfiques. Sachant qu'il faut un lot de souris infectées/non traitées et un lot de souris non infectées/non traitées en plus des 9 lots précédents et que chaque lot compte 10 souris, il faudra 111 souris transgéniques pour l'ensemble du protocole.

La finalité de ce projet est de mettre au point une thérapie anti-adhésive alternative aux traitements antibiotiques actuels ciblant les *Escherichia coli* associés à la MC afin de diminuer l'inflammation chronique intestinale. Il est nécessaire de tester ces molécules *in vivo*, car il n'existe pas de méthode alternative permettant de prendre en compte l'influence de l'environnement du tractus digestif et d'étudier la réponse de l'hôte.

357- Le cerveau est un organe complexe composé d'une grande variété de cellules dont les neurones qui jouent un rôle fondamental dans le traitement et la transmission des informations. Ces neurones sont composés de 2 types cellulaires : les cellules pyramidales excitatrices qui représentent 80% des neurones et les interneurons inhibiteurs qui représentent 20% des neurones et dont les rôles sont encore mal compris. Nous savons que ces neurones sont organisés sous forme de réseaux très spécifiques qui relient les différentes aires du cerveau entre elles. Ces réseaux sont très mal connus à ce jour et il est donc impossible de remplacer les études sur les animaux par celles sur des modèles théoriques. Une compréhension plus fine de ces réseaux devrait permettre une meilleure prise en charge de nombreuses pathologies dans lesquelles la régulation de la perfusion cérébrale est perturbée comme c'est le cas lors de l'Accident Vasculaire Cérébral (AVC 2ème cause de mortalité chez l'homme), l'Accident Ischémique Transitoire (AIT) et de la maladie d'Alzheimer.

Récemment, nous avons démontré que l'activation spécifique de certaines populations d'interneurones exprimant une protéine particulière la parvalbumine (PV) dans un modèle de souris transgénique jouait un rôle fondamental dans la régulation de la perfusion corticale. Cette étude a été réalisée initialement *in vitro* en tranches de cerveau de souris transgéniques particulière (PV-CRE) permettant l'expression d'une construction optogénétique que nous avons développé.

Cet outil permet d'activer ou d'inhiber spécifiquement les interneurons à décharge rapide PV grâce à l'application de lumière sur le tissu. Nous souhaitons maintenant étendre notre étude à d'autres populations comme les interneurons exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP) ce qui nécessitera l'utilisation d'autres lignées de souris transgéniques (VIP-CRE, Ai27-LSL-ChR2-tdTomato et Thy1-ChR2-YFP).

Nous souhaitons étudier le rôle des interneurons PV et VIP in vivo en condition normale et pathologiques (AVC). Nous avons développé une nouvelle technique d'imagerie à haute résolution qui utilise des ultrasons pour suivre les variations de sang dans tout le cerveau sur les rongeurs. Afin de réduire le nombre d'animaux et de pouvoir répéter les expériences sur un même animal au cours du temps, nous avons développé un protocole d'imagerie en condition chronique basé sur la réalisation d'un amincissement du crâne. Ce protocole doit encore être validé chez la souris et chez le rat par une série d'analyses immuno-histochimiques afin de nous assurer que ce geste chirurgical n'entraîne aucune inflammation du cerveau et par conséquent une modification potentielle de sa physiologie. En parallèle, nous développons de nouveaux outils pour l'activation de populations spécifiques de neurones in vivo chez la souris et le rat.

Ces expériences seront réalisées en limitant le stress préopératoire, les douleurs opératoires et post-opératoire par utilisation d'anesthésiques-analgésiques adaptés, de médicaments anti-inflammatoires et en réalisant un suivi post-opératoire constant.

Nous avons planifié ces expériences sur une période de 5 ans comprenant la mise au point et la réalisation de ces expériences qui nécessitera l'utilisation de 1987 animaux (1543 souris et 444 rats).

358- Nous développons au laboratoire des formes galéniques de type "sol-gel" permettant l'administration de médicament dans la bouche (voie buccale, dépôt sur la muqueuse buccale). En effet l'utilisation de ce site d'administration permet d'éviter la destruction du médicament dans l'estomac ou l'intestin et son élimination par le foie. De plus, la muqueuse buccale présente une excellente accessibilité en particulier en pédiatrie et gériatrie. Enfin, la muqueuse buccale possède une vascularisation très développée ce qui facilite la diffusion du médicament dans le sang. Les sol-gels que nous étudions ont la particularité d'être sous forme de solution à température ambiante et sous forme de gel à 37°C.

Les expériences chez l'animal consistent dans un premier temps à évaluer l'adhérence à la cavité buccale des sol-gels développés (mucoadhésion). Dans un second temps, nous évaluerons la durée de vie du médicament dans le sang (pharmacocinétique).

Pour effectuer cette étude, un marqueur (fluorophore) sera incorporé dans le sol-gel afin de pouvoir suivre son devenir c'est-à-dire sa persistance dans la cavité buccale et son élimination de l'organisme. Pour cela les sol-gels seront appliqués sur la muqueuse buccale de lapins, le suivi du fluorophore pourra être effectué avec une caméra et la quantité de médicament dans le sang sera évaluée après prélèvement sanguin (veine marginale de l'oreille). L'évaluation in vivo de ces sol-gels est d'une évidente nécessité et le choix du lapin se justifie du fait de la taille de l'animal (cavité buccale accessible et permettant le dépôt du produit testé sur une surface significative) et des similitudes des muqueuses buccales du lapin et de l'homme. En utilisant 24 lapins par an pendant 2 ans (48 lapins au total), 24 échantillons (8 échantillons par médicament pour 3 médicaments) seront évalués au niveau de la capacité de mucoadhésion et de la pharmacocinétique.

359- Le maintien de la masse musculaire, et donc de l'homéostasie protéique, est un objectif majeur dans de nombreuses situations physiopathologies entraînant une sarcopénie (cancers, immobilisation prolongée...), mais aussi, plus banalement, lors du vieillissement des individus. La préservation de la masse musculaire lors de l'amaigrissement des sujets obèses ou en surpoids est une autre priorité, qui doit être prise en compte dans les stratégies nutritionnelles visant à l'amaigrissement. C'est cette population à risque qui sera la cible du projet, à travers une étude menée chez le rat.

Les acides gras polyinsaturés n-3 (oméga-3) sont bien connus pour réguler de nombreuses voies métaboliques. Or, leurs effets sur le métabolisme protéique a été très peu exploré, bien que les quelques études disponibles plaident en faveur de leurs effets favorables sur le maintien de l'homéostasie protéique. Le projet repose sur l'hypothèse que les oméga-3 peuvent, en améliorant la sensibilité à l'insuline, entraîner des effets favorables sur le métabolisme protéique. La population visée sera celle des sujets obèses et en surpoids, à travers une étude menée chez un rongeur modèle d'obésité.

Il s'agira de soumettre des rats à une restriction calorique visant à une perte de poids selon un protocole identique à celui utilisé chez l'Homme obèse. Avant et pendant cette restriction calorique, certains groupes de rats recevront des régimes riches en AGPI n-3 afin de favoriser l'action de l'insuline sur le métabolisme protéique, et donc de limiter la perte de masse musculaire. Ce projet étant développé en partenariat avec la filière des oléoprotéagineux, il s'agira de comparer des oméga-3 fournis par des huiles végétales à des oméga-3 fournis par des huiles de poisson, dans l'idée de tester la possibilité de contribuer à la préservation des ressources halieutiques en faisant appel à des ressources végétales.

Avantages attendus. L'objectif principal du projet concerne donc la santé humaine. Il est de proposer des stratégies nutritionnelles aux personnes faisant l'objet, volontairement ou non, d'un amaigrissement, avec en parallèle un objectif environnemental de préservation des ressources naturelles.

Ce projet concerne en tout 64 rats femelles de souche Sprague-Dawley, chez lesquels les seuls dommages potentiels seraient liés à l'hébergement en cage individuelle et à la restriction calorique. S'agissant d'une étude préclinique, il n'y a pas de remplacement possible au vu des critères retenus (mesure de la composition corporelle, exploration de la sensibilité à

l'insuline). Le découpage du projet en deux phases, permettant d'ajuster le nombre de groupes et de rats par groupe, ainsi que les conditions nutritionnelles, lors d'une phase préalable, répond aux exigences de réduction et de raffinement.

360- Le MLC 901 est un composé issu de la médecine traditionnelle chinoise. Les données ethnopharmacologiques recueillies sur ses indications coutumières ont justifié l'exploration de ses effets thérapeutiques dans le traitement des accidents vasculaires cérébraux. Les expériences réalisées au laboratoire chez la souris et le rat ont confirmé que le MLC901 protégeait efficacement le cerveau contre les conséquences délétères de ce type de pathologies. Certaines des données comportementales collectées lors de ces expériences étaient toutefois inattendues. Il s'est ainsi avéré que le MLC901 réduisait fortement l'intensité de la réponse conditionnée de souris, cérébrées ou non, ayant été soumises à un protocole de conditionnement de la peur. Ces résultats préliminaires suggèrent que le MLC901 pourrait représenter un outil innovant dans le traitement des troubles anxieux dans lesquels les phénomènes de conditionnement jouent un rôle central. En outre, de tels effets pourraient contribuer à l'action bénéfique du composé dans les cas de lésions cérébro-vasculaires ou traumatiques.

Notre objectif principal est d'identifier plus précisément les effets comportementaux du MLC901 sur la peur conditionnée et d'en appréhender les mécanismes moléculaires et neurophysiologiques. L'aspect comportemental de ce travail reposera principalement sur deux tests complémentaires : le test de l'évitement passif et le test de peur conditionnée proprement dit. Des tests permettant de vérifier les effets du composé sur les capacités mémorielles non-émotionnelles des souris (mémoire de référence spatiale et mémoire des objets) seront menés parallèlement. L'influence du produit sur l'anxiété non-associative (anxiété « spontanée » qui ne repose pas sur un conditionnement) sera également évaluée dans les tests du labyrinthe en croix et du champ ouvert. Les cerveaux des animaux seront prélevés afin d'être soumis à une analyse anatomo-fonctionnelle.

De par son approche comportementale, notre étude exclue toute alternative à l'expérimentation animale. Elle permettra cependant d'optimiser les futurs travaux *in vitro* visant à identifier précisément les mécanismes moléculaires sollicités par le MLC901.

L'ensemble des expériences prévues dans le cadre de ce projet seront menées chez des souris de souche C57BL/6. La souris est un modèle d'étude classique permettant de prédire de manière fiable les effets pharmacologiques observés chez l'homme. Nous avons choisi des animaux de lignée C57BL/6 car ce sont les mieux documentés de la littérature scientifique sur les plans physiologique, pharmacologique et comportemental. D'autre part, l'utilisation de souris consanguines, comme le sont les souris C57BL/6, limite les variations inter-individuelles observées dans les tests biologiques ou comportementaux. In fine, ces particularités permettront de réduire les effectifs d'animaux utilisés dans notre étude tout en préservant la validité statistique. Le nombre total de souris nécessaire à la réalisation de ce travail, évalué à 510, est justifié par la nécessité de ne soumettre à chacun des tests comportementaux prévus que des animaux naïfs, n'ayant pas subi d'autres procédures expérimentales. Aucun des tests comportementaux choisis n'est réputé induire de douleurs sévères chez la souris. Les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale après sédation et leur cerveau prélevé pour analyse anatomo-fonctionnelle.

361- La spadine est un peptide de 17 acides aminés synthétisé à partir d'une séquence naturelle 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. La spadine représente un nouveau concept dans la synthèse d'antidépresseurs. Le but de nos recherches est d'emmener la spadine jusqu'au stade de médicament utilisable chez l'Homme. Chez la souris, la spadine perd en environ 7 heures plus de 50% de son activité. Ce qui, transposé à l'Homme, obligerait plusieurs prises journalières avec par conséquent des risques d'oubli et donc une perte importante d'efficacité. Il nous faut donc trouver un analogue de la spadine ayant une meilleure stabilité *in vivo*. Des analogues de la spadine ayant pour but d'améliorer l'efficacité de la molécule sont en cours de développement. De façon à réduire de façon conséquente le nombre d'animaux utilisés, un premier criblage est actuellement effectué par des techniques électrophysiologiques sur une lignée cellulaire qui exprime de façon stable le canal TREK-1. Seul(s) le (ou les, avec un maximum de 3) plus efficace(s) sont (seront) utilisé(s) pour des expériences *in vivo*. Les animaux utilisés seront répartis sur différents tests comme le test de la nage forcée, de la suspension par la queue, la résignation acquise, la suppression de nourriture, la suppression conditionnée de mobilité. Ces tests miment deux processus de désespoir et de résignation qui sont deux sentiments très présents chez les dépressifs. Le test de la nage forcée sera également utilisé pour définir la dose la plus efficace. Les doses testées seront réduites autant que possible et correspondront à la transposition des résultats obtenus par électrophysiologie. De plus, ce test sera également utilisé pour déterminer la stabilité *in vivo* de la spadine et de ses analogues.

En plus des effets antidépresseurs, les effets secondaires seront également abordés. Notamment, les effets sur la douleur thermique, l'épilepsie ou sur la sévérité des accidents vasculaires cérébraux, qui sont des pathologies où l'activation des canaux TREK-1 exerce un effet bénéfique.

L'impact des différents traitements sur la neurogenèse sera également abordé. La neurogenèse est une étape clé de l'action des antidépresseurs.

Toujours avec l'optique, chez l'Homme, de réduire au maximum les risques d'oubli, donc de rendre inefficace le traitement, pour l'analogue le plus efficace une formulation à relargage lent sera mise au point avec une société montpelliéraine. Cette formulation permet à la suite d'une seule injection, d'obtenir un relargage constant et continu sur plusieurs semaines (3 ou 4) du principe actif. L'efficacité de cette formulation devra être confirmée par l'ensemble des tests définis ci-dessus.

Le nombre d'animaux dépendra du nombre d'analogues, on peut estimer le nombre à environ 4200 souris sur 5 ans tout tests confondus. Ce nombre élevé est dû au nombre important de tests à réaliser à la fois avec les analogues natifs et les analogues sous forme de formulations. De plus chaque test est effectué au moins deux fois avec des animaux naïfs. Dans la mesure du possible, les animaux sont utilisés dans plusieurs tests. Le nombre d'animaux sera réduit le plus possible tout en conservant un nombre d'individus suffisant pour avoir des statistiques fiables.

362- Une consommation excessive de fructose mais également un régime enrichi en lipide pourraient participer au développement de la stéatose hépatique et de la dysfonction hépatiques fréquemment observées au cours de l'obésité. L'un des mécanismes impliqués serait une réaction inflammatoire intestinale conduisant à des anomalies du métabolisme local des acides aminés. Ces dernières entraîneraient une détérioration de la fonction de barrière intestinale à l'origine d'une translocation bactérienne et d'une diminution de la disponibilité périphérique en arginine qui concourraient au développement d'une stéatose. Le but du protocole proposé est d'évaluer dans quelle mesure l'apport de différents acides aminés (AAs) pourrait prévenir l'altération de la fonction hépatique lors d'une surcharge pondérale. Ensuite, il s'agira de déterminer les mécanismes de leur action.

363- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente du système moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100000 habitants).

A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales; parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (SOD1). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point et reproduisent les principales caractéristiques et les symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs: les neurones moteurs supérieurs, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs inférieurs, situés dans la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques. Cette atteinte cellulaire conjointe représente l'un des éléments discriminant du diagnostic de la SLA.

Malgré cette description clinique précise, il est frappant de noter que les recherches précliniques se sont jusqu'à présent focalisées sur les neurones moteurs inférieurs, faisant des neurones moteurs supérieurs, et du cortex moteur en général, les « grands oubliés » de l'échiquier de la SLA. Face aux échecs répétés des essais thérapeutiques, la question du rôle des neurones moteurs supérieurs dans le déclenchement et la progression de la SLA apparaît plus que jamais pertinente. L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence la contribution du dysfonctionnement et/ou de la perte des neurones moteurs supérieurs, et autres populations de neurones corticaux, dans la pathophysiologie de la SLA. Pour ce faire, nous proposons de développer différents modèles de souris transgéniques où le gène de la SOD1 sera éliminé spécifiquement de certains types cellulaires (neurones moteurs supérieurs, interneurones corticaux inhibiteurs) et maintenu dans le reste des cellules de l'organisme. Ces nouveaux modèles murins permettront d'étudier le rôle spécifique de certains types cellulaires sur le comportement moteur et l'espérance de vie d'un nombre précis d'animaux. Cette approche permettra en outre d'apporter des réponses sur l'origine de la maladie (corticale ou spinale) et d'informer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Au delà de la SLA, ce projet innovant est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur.

364- Le présent projet a pour but de développer un modèle de métastases osseuses de cancer de la prostate. Pour cela, des cellules tumorales de rat, d'origine prostatique, seront injectées dans le fût diaphysaire de fémurs de 92 rats Sprague-Dawley OFA. Différentes quantités de cellules et différents modes d'injections seront testés afin de se rapprocher le plus possible du tableau clinique des lésions observées au cours du développement de métastases osseuses de carcinome prostatique chez les patients, à savoir une trame osseuse anarchique et désorganisée, associant des plages d'ostéolyse (forte dégradation osseuse) et d'ostéocondensation (forte formation osseuse). Afin d'évaluer dans le temps le développement des métastases osseuses, une partie des animaux seront euthanasiés à J14 et J24 après l'injection des cellules. L'intégralité des animaux sera euthanasiée à la fin du protocole (J35). L'utilisation d'un tel modèle mimétique de la pathologie humaine, permettra d'évaluer le potentiel antitumoral, anti-destruction osseuse ou pro-formation osseuse de nouvelles molécules ayant déjà prouvées leur efficacité in vitro. Toutefois, la pathologie induit de fortes douleurs qui seront aussi importantes dans le modèle animal que nous souhaitons développer. Ainsi, un suivi clinique quotidien sera réalisé et un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Le nombre total d'animaux est justifié par un nombre minimum de 2 à 5 animaux par groupe (selon les groupes) à euthanasier à chaque point de cinétique et des pertes possible suite aux anesthésies.

L'os est un tissu complexe en perpétuel renouvellement incluant une phase de dégradation osseuse par les ostéoclastes et une phase de néoformation osseuse par les ostéoblastes. Dans le cas des métastases osseuses, les cellules tumorales activent l'un ou l'autre (ou les deux) type de cellules osseuses qui en retour activent les cellules tumorales induisant l'établissement d'un cercle vicieux. Cette complexité ne peut être mimée autrement que dans un modèle animal dans lequel tous les paramètres sont retrouvés.

365- L'adeno-associated virus (AAVr) est un vecteur recombinant très utilisé en thérapie génique à des fins d'étude préclinique ou à des protocoles cliniques chez l'homme. Le sérotype 8 montre des résultats prometteurs et particulièrement dans le traitement de maladies affectant le foie.

Ce projet a pour but d'évaluer la capacité de transduction de l'AAV2-8 purifié par un nouveau procédé de purification dans des hépatocytes murins in vivo. En effet la caractérisation in vitro de ce vecteur n'est pas suffisante et doit être complétée par la preuve de transduction et de tolérance des cellules in vivo.

Ainsi, un groupe de souris (n=4) sera injecté avec un vecteur contrôle purifié par le procédé classique, et un second groupe (n=4) avec le vecteur purifié par le nouveau procédé.

Cette étude permettra de choisir le procédé de purification des vecteurs viraux qui sera utilisé à grande échelle afin d'être utilisé dans des protocoles cliniques chez l'homme

366- Les espèces Porc, Lapin, Rat et Souris permettent l'apprentissage de certaines techniques chirurgicales (anastomoses vasculaires, certaines anastomoses digestives, prise en charge des saignements,...) ou de certaines techniques d'anesthésie ou d'injection ne pouvant être modélisées in vitro pour les étudiants scientifiques et chirurgiens. De façon complémentaire, des peaux artificielles et des simulateurs de chirurgie sont déjà utilisés pour permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés.

367- La sclérose en plaques (SEP) est une maladie du cerveau et de la moelle épinière qui touche plus de 80 000 personnes en France. Elle se manifeste par une faiblesse musculaire des jambes et des bras, une fatigue intense, une perte de la coordination musculaire et de l'équilibre, des troubles de la sensation (picotements, engourdissements) et des douleurs. Dans un grand nombre de cas, une évolution progressive s'installe sur plusieurs décennies vers un état de paralysie générale et un état grabataire précédant le décès.

Les origines de la SEP restent encore mal comprises. La SEP serait liée à l'apparition de lésions cérébrales induites par la destruction de la myéline, la gaine protectrice entourant le prolongement des neurones. Une activation anormale du système immunitaire contre la myéline pourrait expliquer l'apparition de ces lésions.

Aujourd'hui, les seuls traitements existants visent seulement à diminuer l'activité du système immunitaire. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches et proposer des alternatives thérapeutiques.

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de SEP présentent une augmentation importante dans leurs gènes de certaines séquences par rapport à des volontaires sains. Ces séquences sont responsables de la production d'une protéine (nommée ENV) qui active très fortement le système immunitaire. Cette protéine ENV pourrait donc être responsable de l'apparition des lésions nerveuses caractéristiques de la SEP.

Nous disposons actuellement de molécules capables de neutraliser la protéine ENV. Ces molécules sont donc très prometteuses pour le traitement de la SEP. Néanmoins, les réglementations actuelles ne permettent pas de tester directement une molécule chez l'Homme sans avoir recours au préalable à des tests chez l'animal. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les effets bénéfiques de ces molécules sur des modèles animaux qui miment la SEP.

Dans ce projet, nous utiliserons un modèle développé chez la souris et qui consiste à activer le système immunitaire par la protéine ENV pour détruire spécifiquement la myéline qui entoure les neurones du cerveau et de la moelle épinière. Nous pouvons réaliser ce modèle chez la souris dit « humanisée » car elle a été greffée avec un système immunitaire humain. Ce modèle permet de travailler dans des conditions qui se rapprochent davantage de la maladie humaine. Dans ces deux modèles (souris normale et humanisée), nous avons déjà montré que la protéine ENV est capable de stimuler le système immunitaire et de générer des lésions nerveuses semblables à celles observées dans la SEP. Ces modèles avec la protéine ENV sont donc très pertinents pour étudier la SEP et tester l'effet de nos molécules.

Ce projet a été conçu de façon à utiliser le moins possible d'animaux (2000 sur une période de 5 ans) et à limiter au mieux la douleur, la souffrance ou l'angoisse ressenties par les animaux.

Notre projet représente donc un grand espoir pour les patients atteints de cette maladie invalidante qui génère une profonde souffrance, tant sur le plan physique que psychique, pour le malade et son entourage.

368- La sclérose en plaques (SEP) est une maladie du cerveau et de la moelle épinière qui touche plus de 80 000 personnes en France. Elle se manifeste par une faiblesse musculaire des jambes et des bras, une fatigue intense, une perte de la coordination musculaire et de l'équilibre, des troubles de la sensation (picotements, engourdissements) et des douleurs. Dans un grand nombre de cas, une évolution progressive s'installe sur plusieurs décennies vers un état de paralysie générale et un état grabataire précédant le décès.

Les origines de la SEP restent encore mal comprises. La SEP serait liée à l'apparition de lésions cérébrales induites par la destruction de la myéline, la gaine protectrice entourant le prolongement des neurones. Une activation anormale du système immunitaire contre la myéline pourrait expliquer l'apparition de ces lésions.

Aujourd'hui, les seuls traitements existants visent seulement à diminuer l'activité du système immunitaire. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches et proposer des alternatives thérapeutiques.

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de SEP présentent une augmentation importante dans leurs gènes de certaines séquences par rapport à des volontaires sains. Ces séquences sont responsables de la production d'une protéine (nommée ENV) qui active très fortement le système immunitaire. Cette protéine ENV pourrait donc être responsable de l'apparition des lésions nerveuses caractéristiques de la SEP.

Nous disposons actuellement de molécules capables de neutraliser la protéine ENV. Ces molécules sont donc très prometteuses pour le traitement de la SEP. Néanmoins, les réglementations actuelles ne permettent pas de tester directement une molécule chez l'Homme sans avoir recours au préalable à des tests chez l'animal. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les effets bénéfiques de ces molécules sur des modèles animaux qui miment la SEP.

Nous avons développé chez la souris des modèles qui consistent à activer le système immunitaire avec la protéine ENV pour détruire spécifiquement la myéline qui entoure les neurones du cerveau et de la moelle épinière. Ces modèles avec la protéine ENV sont donc très pertinents pour étudier la SEP et pour tester l'effet de nos molécules.

Néanmoins, ils sont très lourds et peuvent induire une douleur modérée chez les animaux. L'objectif de ce projet est donc de sélectionner les molécules les plus efficaces en réalisant des tests simples chez l'animal pour réduire le nombre de molécules à tester sur des modèles animaux plus lourds.

Dans ce projet, nous étudierons l'activation du système immunitaire par la protéine ENV chez l'animal entier ou sur des cellules et nous testerons la capacité de nos molécules à réduire cette activation.

Ce projet a été conçu de façon à utiliser le moins possible d'animaux (1500 sur une période de 5 ans) et à limiter au mieux la douleur, la souffrance ou l'angoisse ressenties par les animaux.

Notre projet représente donc un grand espoir pour les patients atteints de cette maladie invalidante qui génère une profonde souffrance, tant sur le plan physique que psychique, pour le malade et son entourage.

369- La sclérose en plaques (SEP) est une maladie du cerveau et de la moelle épinière qui touche plus de 80 000 personnes en France. Elle se manifeste par une faiblesse musculaire des jambes et des bras, une fatigue intense, une perte de la coordination musculaire et de l'équilibre, des troubles de la sensation (picotements, engourdissements) et des douleurs. Dans un grand nombre de cas, une évolution progressive s'installe sur plusieurs décennies vers un état de paralysie générale et un état grabataire précédant le décès.

Les origines de la SEP restent encore mal comprises. La SEP serait liée à l'apparition de lésions cérébrales induites par la destruction de la myéline, la gaine protectrice entourant le prolongement des neurones. Une activation anormale du système immunitaire contre la myéline pourrait expliquer l'apparition de ces lésions.

Aujourd'hui, les seuls traitements existants visent seulement à diminuer l'activité du système immunitaire. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches et proposer des alternatives thérapeutiques.

Plusieurs études ont montré que les patients atteints de SEP présentent une augmentation importante dans leurs gènes de certaines séquences par rapport à des volontaires sains. Ces séquences sont responsables de la production d'une protéine (nommée ENV) qui active très fortement le système immunitaire. Cette protéine ENV pourrait donc être responsable de l'apparition des lésions nerveuses caractéristiques de la SEP.

Nous disposons actuellement de molécules capables de neutraliser la protéine ENV. Ces molécules sont donc très prometteuses pour le traitement de la SEP. Néanmoins, les réglementations actuelles ne permettent pas de tester directement une molécule chez l'Homme sans avoir recours au préalable à des tests chez l'animal. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer les effets bénéfiques de ces molécules sur des modèles animaux qui miment la SEP.

Nous avons développé chez la souris des modèles qui consistent à activer le système immunitaire avec la protéine ENV pour détruire spécifiquement la myéline qui entoure les neurones du cerveau et de la moelle épinière. Ces modèles avec la protéine ENV sont donc très pertinents pour étudier la SEP et pour tester l'effet de nos molécules.

Néanmoins, ces modèles sont un peu éloignés de la réalité de la maladie car la protéine ENV est introduite de manière artificielle chez la souris alors qu'elle est produite naturellement chez l'Homme. Récemment, nous avons créé des souris transgéniques qui peuvent, dans certaines conditions, produire de la protéine ENV soit dans tout l'organisme sans uniquement dans le cerveau et la moelle épinière.

L'objectif de ce projet est donc de vérifier si les souris transgéniques produisant la protéine ENV miment la SEP et de tester les effets bénéfiques de nos molécules.

Ce projet a été conçu de façon à utiliser le moins possible d'animaux (2500 sur une période de 5 ans) et à limiter au mieux la douleur, la souffrance ou l'angoisse ressenties par les animaux.

Notre projet représente donc un grand espoir pour les patients atteints de cette maladie invalidante qui génère une profonde souffrance, tant sur le plan physique que psychique, pour le malade et son entourage.

370- 1) Objectif éducatif du projet

Chaque année des nouveaux stagiaires, étudiants, techniciens et chercheurs deviennent utilisateurs de notre plateforme d'expérimentation animale sur les souris. Nous voulons proposer à ces nouveaux entrants une formation sur 5 jours leur permettant d'acquérir les gestes techniques de bases en expérimentation sur la souris (contentions des animaux sans stress, injections sc./ip./po/iv, prélèvements sanguins, anesthésie, mise à mort, autopsie). Cette formation aurait lieu en présence d'un formateur compétent et titulaire du Niveau 1 ou 2 en expérimentation animale. Cinq séances d'une heure seront destinées à la mise en pratique de 2 gestes techniques/jour (5 souris/geste).

2) Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Cette formation de base des nouveaux entrants est indispensable afin de s'assurer qu'ils maîtrisent les gestes techniques qu'ils seront amenés à réaliser seuls (s'ils sont détenteurs du Niveau 1 ou 2 en expérimentation animale) dans les protocoles qu'ils devront mettre en œuvre.

Le nombre de souris utilisées (N= 10/nouvel entrant) dans la procédure expérimentale associée à ce projet est réduite au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux sans pour autant mettre en péril le bien être de l'animal au cours de la semaine d'apprentissage. Les gestes expérimentaux proposés sont tous d'une classe de gravité légère dans la mesure où ils sont bien maîtrisés. Des points limites prédictifs d'un échec de la maîtrise du geste ont été définis afin d'éviter toute souffrance de l'animal. Si ces points limites sont atteints, cela conduira à sa mise à mort immédiate par le formateur. Les gestes techniques difficiles à acquérir seront réalisés sous anesthésie générale et sans réveil de l'animal (prélèvements sanguins rétro-orbitaires ou submandibulaires). Les souris utilisées dans ces procédures sont toutes des souris de réforme, produites en élevage au sein de notre plate forme et non incluses dans des projets (génotype non relevant ou sexe non compatible avec le projet). Les animaux retenus pour cette formation sont sélectionnés par le responsable du « bien être animal » de notre plateforme et ne doivent pas présenter de phénotype nocif au jour d'inclusion ou avoir été préalablement utilisé dans un autre protocole expérimental.

3) Nombre d'animaux: 1250 souris sur cinq ans pour une prévision de 25 nouveaux entrants/an

371- Les Norovirus sont maintenant reconnus comme la cause principale de gastroentérites non bactériennes aiguës, à la fois chez les enfants et les adultes. Ces gastroentérites affectent mondialement des millions de personnes. L'identification rapide des Norovirus est essentielle pour mettre en place des mesures de prévention qui permettront de réduire la propagation de l'épidémie. La méthode standard pour la détection des Norovirus est la PCR en temps réel, mais cette technique est longue et nécessite des équipements lourds que seuls des laboratoires spécialisés possèdent.

Dans ce contexte, nous désirons développer un test immuno-chromatographique rapide permettant la détection des Norovirus dans les selles. Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux très sensibles. Ces anticorps ne sont pas commercialement disponibles.

De nombreux essais d'immunisations réalisés depuis 2008, pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, ont démontré la faisabilité de l'approche mais n'ont pas permis d'obtenir des anticorps répondant à nos besoins. Les anticorps polyclonaux sont connus et utilisés pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux.

C'est dans ce contexte que nous soumettons ce protocole d'immunisation pour approbation. Ce protocole conduira à l'obtention d'un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux (3 lapins), l'immunogène et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injection et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les animaux retenus devraient, en outre, permettre de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums étant considérés comme stock patrimoine dans notre société, c'est à dire sans date d'expiration.

372- Production de sérum de mouton anti Entéro Toxine Staphylococcique (SET): Les anticorps de mouton anti SET ainsi produits sont poolés puis purifiés pour être utilisés dans le test de dosage VIDAS Staph enterotoxin II (SET II, technique ELISA) qui permet en tant que contrôle microbiologique la détection des entérotoxines de Staphylocoques dans les produits alimentaires.

373- Les souris transgéniques sont les animaux de laboratoire les plus utilisés et les plus échangés dans le monde. Lors de ces échanges, il est indispensable de conserver les statuts sanitaires des animaleries importatrices. La possibilité de contamination des souris durant le transport augmente encore ce risque sanitaire.

Au niveau de notre Institut, nous devons donc limiter au mieux les risques de contamination liés à l'importation de souris transgéniques (en moyenne 20 lignées par an) ou à l'introduction directe de souris de lignées consanguines ou non consanguines dans nos animaleries et dont la capacité totale d'hébergement est de 65 000 souris.

De plus, nous avons aussi des animaleries de statuts sanitaires différents au sein de notre Institut (conventionnel ou Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique = EOPS) et, de ce fait, les échanges de lignées de souris ne peuvent donc pas la aussi se faire directement.

La création de lignées transgéniques prenant beaucoup de temps, leur valeur scientifique étant importante et un projet de recherche demandant le plus souvent l'utilisation de nombreuses lignées sur le long terme, le transfert d'embryons est la méthode actuellement la plus sûre pour garantir au mieux le statut sanitaire de nos animaleries.

Pour obtenir les embryons, cette technique nécessite l'utilisation de 300 souris par an (soit 1500 souris sur 5 ans) afin d'obtenir des modèles de souris génétiquement modifiées pour des gènes d'intérêt et leur phénotypage (recherche de caractères observables chez un individu) afin de trouver des modèles de maladie humaine ainsi que des voies thérapeutiques pour l'Homme ou de manière plus fondamentale d'étudier la fonction des gènes.

L'objectif de la cryopréservation d'embryons est de se protéger contre la perte de stocks de souris précieuses par échecs d'élevage ou par maladies ou en cas d'incidents (inondation par exemple). Cela permet aussi de réduire le nombre d'animaux en ne maintenant pas des lignées de souris qui ne sont pas activement utilisées et garantit la disponibilité future d'un modèle animal.

En moyenne, 40 lignées sont cryopréservées par an.

Pour obtenir les embryons, cette technique nécessite l'utilisation de 1800 souris par an (soit 9000 souris sur 5 ans).

Le bien-être des souris indispensables au transfert d'embryons et à la cryopréservation est également une préoccupation permanente pour notre Institut et, en conséquence, nous essayons donc de répondre au mieux aux exigences de réduction et de raffinement de la règle des 3R.

374- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...) de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en orthopédie (évaluation de l'intégration osseuse, propriétés biomécaniques). Les petits ruminants, les lagomorphes et les rongeurs sont alors des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 1000 lapins, 900 rats, 400 ovins, 100 caprins et 100 chiens.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les rongeurs et les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes ; de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin

375- Au cours des 20 dernières années, la résistance aux antibiotiques a considérablement évolué alors que parallèlement la recherche de nouveaux antibiotiques s'est essoufflée. L'émergence de bactéries dites toto-résistantes est devenue une préoccupation des pouvoirs publics. L'utilisation d'alternative aux antibiotiques devient aujourd'hui une priorité de santé publique. Nous avons développé des liens avec une industrie spécialisée dans la fabrication de produits extraits de plantes à propriétés antibactériennes. Ces produits ont été testés in vitro dans notre laboratoire.

Les résultats ont été suffisamment convaincants pour développer un projet de thèse autour de la validité in vivo de ces produits pour leurs propriétés intrinsèques antibactériennes ou leurs propriétés de synergie in vitro avec les antibiotiques.

Un brevet est en cours de dépôt en collaboration entre l'entreprise et l'Université d'Angers. Une thèse de type CIFRE en contrat entre l'Université d'Angers et l'industriel a pour objectif suivant: évaluer la pharmacocinétique d'un produit antibactérien dans le sang : AT110 (les 4 composés majoritaires isolés d'un mélange d'huiles essentielles). AT110 sera administré en une seule fois. Deux voies d'administration sont testées: la voie intra péritonéale et veineuse. Après des temps d'attente prédéfinis, les souris sont euthanasiées et leur sang est prélevé en intracardiaque. Le sérum est récupéré après

centrifugation, et est testé en ex vivo par sa mise en contact avec une suspension bactérienne d'*Acinetobacter baumannii* (souches SAN et mucoïde) afin d'évaluer sa bactéricidie et donc de déterminer s'il y a passage ou non d'AT110 dans le sang des animaux.

Un aliquote de sérum, le poumon le foie et les reins seront prélevés pour des études de pharmacocinétique ultérieures en chromatographie en phase gazeuse.

376- La sclérose en plaques (SEP) représente la deuxième cause de handicap non traumatique chez les jeunes (20 et 40 ans) et constitue un véritable problème de santé publique. Ainsi, chaque année sont nouvellement diagnostiqués environ 7 cas pour 100 000 habitants pour un total d'environ 2.5 millions de personnes dans le monde.

Il s'agit d'une maladie auto-immune inflammatoire, démyélinisante et dégénérative du système nerveux central (SNC). Elle se caractérise par une symptomatologie variée alliant à la fois des manifestations physiques (ataxie, tremblements, etc.) et des signes moins perceptibles de type dépression, fatigue, etc., indiquant l'implication du système nerveux moteur, sensoriel, visuel et autonome. Depuis 1995, le traitement type de la SEP s'appuie sur des molécules immuno-modulatrices et/ou immunosuppressives au spectre d'action large dont les effets sur le système immunitaire sont encore mal compris. A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique vis à vis de cette maladie.

Les helminthes sont reconnus comme des agents infectieux pouvant avoir des effets bénéfiques sur l'hôte notamment dans les maladies auto-immunes. Ainsi, les infections dues aux schistosomes ou une simple exposition à ceux-ci offrent une protection/résistance à toute une variété de désordres auto-immuns dans des modèles expérimentaux d'animaux : diabète de type 1, sclérose en plaque, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Graves, asthme et maladie inflammatoire de l'intestin. En effet, ils modifient le développement d'une réponse de type Th1, induisent un profil cytokinique de type Th2 et stimulent les lymphocytes T régulateurs.

Plusieurs études ont montré que dans des modèles animaux d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (modèle animal de sclérose en plaques), une infection à *Schistosoma mansoni* retardait et diminuait la maladie ainsi qu'une modification des profils cytokiniques (Th1 à Th2). De plus, des données épidémiologiques ont mis en évidence que des patients atteints de sclérose en plaque et infectés par des helminthes présentaient une diminution du nombre de poussées et une réduction du nombre de lésions.

Notre laboratoire a identifié des propriétés particulières d'une protéine parasitaire (actuellement en phase clinique 3). Des travaux complémentaires sur des modèles de rats et de souris simulant la maladie de Crohn (maladie inflammatoire chronique de l'intestin) ont montré des résultats surprenants. En effet, une diminution de 30% du score macroscopique a pu être observée. Cette maladie auto-immune présentant des similitudes avec la sclérose en plaques (Th1), il nous est donc apparu nécessaire de tester notre molécule en tant que nouvelle thérapeutique dans un modèle expérimental d'EAE. Pour répondre à cette problématique, une EAE (Encéphalomyélite auto-immune expérimentale) active, sera induite sur des souris SJL et C57BL/6 (n=5 min/groupes) par leur immunisation avec la MBP (myelin basic protein).

377- L'agressivité du glioblastome, une tumeur cérébrale de haut grade chez l'homme, est corrélée positivement à la présence de cellules cancéreuses à caractère souche (CCCS). Ces cellules sont situées dans une niche où elles établissent des interactions privilégiées avec les cellules vasculaires. Des travaux ont montré que ces cellules produisent des facteurs cruciaux pour la survie des CCCS. Parmi eux, nous avons récemment identifié une molécule libérée par les cellules vasculaires, et qui peut agir directement sur les CCCS grâce à deux récepteurs. Nos données actuelles ont permis en effet d'identifier cet axe de communication comme jouant un rôle clé dans le maintien des propriétés souches des CCCS. Nos résultats in vitro ont posé les bases moléculaires visant à interférer avec les échanges entre les cellules vasculaires et les CCCS. Il sera désormais important de déterminer l'effet du blocage de cet axe sur la formation des tumeurs in vivo. Les expériences seront réalisées chez la Souris (*Mus musculus*, BALB/C nude) avec un total de 36 animaux. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient permettre d'apporter la preuve de concept que la molécule identifiée dans les cellules vasculaires pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement des tumeurs du cerveau.

378- Ce projet de recherche européen, nommé Switchbox, vise à comprendre à quel niveau les hormones thyroïdiennes (HTs) sont impliquées dans le processus du vieillissement. Il implique plusieurs laboratoires européens travaillant sur 3 modèles, l'Homme, la souris et le rat. L'objectif de Switchbox est d'exploiter une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'homéostasie afin de permettre le maintien en bonne santé tout au long de la vie. En effet, outre l'effet largement décrit des HTs sur le métabolisme, une corrélation négative entre les taux d'HTs et la longévité a récemment été mise en évidence chez l'Humain et la Souris. Nos travaux sont donc dédiés à la compréhension des mécanismes qui sous-tendent ce lien entre HTs et vieillissement, avec comme angle d'étude le rôle des HTs dans le contrôle du métabolisme énergétique lors du vieillissement.

Nous utiliserons dans ce projet uniquement le modèle souris (*Mus musculus*) pour plusieurs raisons :

- de nombreux mécanismes physiologiques et comportementaux impliqués dans le maintien de la balance énergétique et le vieillissement sont déjà bien décrits,

- étant de petite taille, la souris est facile à maintenir en animalerie, avec un taux de reproduction élevé. Par ailleurs, tous les protocoles utilisés dans les projets de recherche ont été optimisés pour la souris, avec un contrôle maximum des paramètres vitaux.

Deux souches de souris ont été sélectionnées dans ce projet:

Une première souche référence (C57BL/6), la plus utilisée par les laboratoires de recherche.

Une deuxième souche d'intérêt (WSB/EiJ) qui présente 1) des taux d'HTs plasmatiques plus bas que les souris C57BL/6, ceci étant associé à 2) une longévité plus grande.

En fonction des protocoles expérimentaux appliqués, les souris peuvent être soumises à des régimes alimentaires particuliers, comme la diète hyperlipidique (45% des calories venant des matières grasses). Par ailleurs, l'effet de l'âge sera évalué en expérimentant des souris à différents âges (adulte : 3 mois ; âgé : 18 mois).

A partir d'une approche comparative entre ces deux souches de souris, nous allons évaluer le rôle de la signalisation thyroïdienne dans le contrôle de l'homéostasie au cours du vieillissement. Ceci se fera à de nombreux niveaux, tant métaboliques, qu'hormonaux ou génétiques.

Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés dans ce projet, de nombreuses analyses *in silico*, ne nécessitant aucune utilisation d'animal, seront réalisées. En revanche, l'exploration de certains paramètres physiologiques implique obligatoirement l'utilisation d'animaux. Les procédures appliquées (dans le respect du bien-être animal et par un personnel spécifiquement formé) visent toujours à limiter le nombre d'animaux utilisés, dans la limite des besoins en terme d'analyse statistique (N=6-8 par groupe expérimental). Cela peut impliquer par exemple la réutilisation de certains animaux dans plusieurs procédures (en respectant une période de récupération), dans le cas où le bien-être de l'animal n'est pas affecté. Compte-tenu de l'ampleur de ce projet et du nombre de procédures impliquées, nous estimons à 1000 le nombre maximum de souris nécessaires pour répondre à nos questions, sur la durée du projet (5 ans).

379- La tuberculose (TB) reste une menace majeure pour la santé publique mondiale malgré la présence sur le marché d'antibiotiques et d'un vaccin préventif, le BCG (Bacille de Calmette-Guérin). En effet, il est estimé, qu'à travers le monde, 3 milliards de personnes sont infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb). Chaque année 10 millions de nouveaux cas de tuberculose et 2 millions de morts sont recensés. 10% des personnes nouvellement infectées développeront une tuberculose active. Les autres ne présenteront aucun signe clinique et rentreront en phase de tuberculose latente. Au cours de leur vie, ces personnes présenteront un risque constant de réactivation de la mycobactérie et ainsi de développer une forme active de tuberculose.

L'approche de notre département de recherche est de développer un vaccin capable de prévenir les différentes phases de la tuberculose. Plusieurs antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* ont été sélectionnés pour constituer des protéines de fusions différentes exprimées par un vecteur viral. Ces antigènes permettent de couvrir les différentes phases de la tuberculose: active, latente et ressuscitation.

Dans un premier temps un protocole standard d'immunisation a été défini. Ce protocole a permis de valider l'immunogénicité de nos candidats vaccins exprimant les antigènes de M.tb sélectionnés. Plusieurs positionnements pour ces candidats vaccins sont envisagés, un positionnement en prophylaxie en boost du BCG et/ou en thérapeutique dans la phase active de la tuberculose.

Ce nouveau protocole a donc pour objectif de documenter la réponse immunitaire spécifique de M.tb induite par un prime BCG et un boost vecteur viral exprimant des antigènes de M.tb. Les souris seront injectées avec le BCG, puis recevront une ou deux injections de nos candidats vaccins pour booster la réponse. Environ 500 souris seront nécessaires pour tester l'ensemble de nos vaccins dans ces schémas d'immunisation.

380- Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : α et β . Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau, mais leurs rôles spécifiques ont été difficiles à évaluer jusqu'à présent en raison de la difficulté à séparer les effets centraux des effets périphériques de l'hormone. Pour contourner ce problème, nous disposons de lignées de souris permettant un ciblage spécifique des récepteurs α du cerveau. Ce projet porte sur l'une de ces lignées, pour laquelle une mutation du récepteur α est exprimée dans toutes les cellules du cerveau (neurones et cellules gliales). Nous avons rapidement observé que la majorité des souriceaux de ce génotype mouraient peu avant le sevrage. Cependant, il a semblé que la mortalité était réduite dans les portées où les mères avaient construit un nid plus fourni que les autres. Cette observation, jointe au rôle connu de l'hormone thyroïdienne dans la thermorégulation, nous a conduits à émettre l'hypothèse qu'un déficit de thermorégulation pourrait être à l'origine de la mortalité précoce des souriceaux de cette lignée.

L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse. Nous augmenterons la quantité de coton distribuée aux mères avant la mise-bas, dans le but d'augmenter la survie des souriceaux. Si nos observations préliminaires se confirment et que les souriceaux atteignent l'âge du sevrage, ils seront sevrés et continueront à être élevés avec beaucoup de coton. Si les souriceaux exprimant la mutation ne survivent pas dans ces conditions, pour les portées suivantes nous essaierons d'augmenter le taux de survie en les élevant dès la naissance à la thermoneutralité (30°C).

Un test de résistance au froid est prévu pour les souris qui atteindront l'âge de 2 mois. Il s'agira de retirer le matériel de construction du nid (ou de placer les souris à 21 °C, si les souris sont élevées à 30°C) pendant au maximum 5 jours et d'observer les conséquences en termes de poids, de prise alimentaire et de composition corporelle.

Nous travaillons avec des souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il est possible de cibler l'expression d'une mutation du récepteur α de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Ce projet concernera 100 souris au maximum. Une attention particulière sera portée au suivi quotidien des portées, de façon à euthanasier tout souriceau présentant des signes de faiblesse marquée.

381- Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau, notamment dans le contrôle des comportements. Nous nous intéressons en particulier aux comportements émotionnels, qui sont importants pour évaluer l'état de bien-être d'un individu. Chez l'homme comme chez l'animal, l'hypothyroïdie s'accompagne de perturbations des comportements émotionnels caractérisées par une augmentation des troubles anxieux et des états de type dépressif, mais le rôle joué par les récepteurs centraux de l'hormone thyroïdienne dans ces phénomènes n'est pas identifié. Le large spectre d'action de l'hormone thyroïdienne dans tout l'organisme est un frein à la compréhension du rôle spécifique joué par cette hormone au niveau central. Pour contourner ce problème, nous disposons de lignées de souris permettant un ciblage spécifique des récepteurs de l'hormone thyroïdienne présents dans le cerveau. Ces lignées constituent un outil de choix pour déterminer dans quelle mesure les récepteurs du cerveau participent au contrôle des comportements émotionnels. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : α et β . Dans une précédente étude, nous avons observé que l'expression d'une mutation du récepteur α dans les neurones entraînait une augmentation modérée, mais significative, de l'expression des comportements d'anxiété. Nous souhaitons maintenant évaluer le rôle des récepteurs centraux de l'hormone thyroïdienne dans un modèle susceptible d'induire un état de type dépressif, une procédure de stress chronique.

Les objectifs de ce projet sont d'une part d'adapter localement une procédure de stress chronique déjà utilisée dans d'autres laboratoires, et d'autre part d'évaluer si l'expression centrale d'une mutation du récepteur α influence la sensibilité des souris à cette procédure. Cette procédure comprend deux grandes étapes qui se superposent partiellement: 1) l'application quotidienne de stress légers et imprévisibles tout au long du protocole ; 2) après un minimum de 5 semaines, placement des souris dans diverses situations de test qui permettent d'évaluer l'altération de leur état émotionnel.

Ce projet nous permettra :

- de valider l'efficacité de notre procédure de stress chronique: nous attendons une augmentation de l'anxiété et une altération de la sensibilité aux stimuli positifs (anhédonie) chez les souris stressées par rapport aux souris non stressées;
- d'évaluer l'influence d'une hypothyroïdie induite chez l'adulte sur la sensibilité au stress chronique ;
- d'évaluer si les souris exprimant une mutation du récepteur α de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau réagissent de la même façon que les souris témoins à la procédure de stress chronique.

Nous travaillons avec des souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il est possible de cibler l'expression d'une mutation du récepteur α de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Ce projet concernera 120 souris au maximum. Une attention particulière sera portée au suivi des souris pendant la procédure de stress chronique, de façon à diminuer la charge de stress appliquée aux souris en cas d'observation de perte de poids ou de dégradation excessive de l'état du pelage.

382- L'Atrophie Optique Dominante (DOA) est une maladie génétique rare (1/20 000) pour laquelle aucune solution thérapeutique n'a été trouvée. Elle se caractérise principalement par des problèmes visuels évolutifs apparaissant dès l'enfance et s'accompagnant à l'âge adulte d'autres symptômes, comme la perte de l'audition, ataxie et myopathie mitochondriale. Cette maladie génétique est due à la transmission de mutations portées par le gène nucléaire OPA 1 dont la protéine est localisée dans la membrane mitochondriale. Ces mutations aboutissent à la réduction des taux de la protéine OPA 1 ou à son invalidation et entraînent entre autre un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire de la mitochondrie aboutissant à une dégénérescence des cellules ganglionnaires rétiniennes.

Le projet a pour objectif principal de rechercher une solution thérapeutique et de tester le composé identifié dans un modèle animal pertinent, qui sont des souris OPA1+/exprimant la forme du gène OPA 1 la plus souvent retrouvée chez les patients (délétion TTAG) aboutissant à la diminution de moitié de l'expression de la protéine. Ces souris seront traitées de façon chronique par le composé puisque la DOA est une maladie évolutive. Ces souris seront testées dans plusieurs modèles expérimentaux (mesures de la locomotion et des potentiels évoqués visuels et auditifs).

Le déroulement de l'étude s'inscrit dans une démarche de réduction du nombre de souris, en associant dans une même étude l'ensemble des paramètres nécessaires, et sur un minimum d'animaux permettant d'assurer une confiance dans les résultats obtenus. Le recours à l'animal est nécessaire pour effectuer un test chronique, du fait de l'apparition tardive des signes cliniques de la pathologie.

383- L'objectif de notre projet est d'étudier les Dystrophies Myotoniques (DM). Il s'agit des myopathies les plus fréquentes chez l'adulte, avec 1 individu touché sur 8000. Ces maladies sont particulièrement invalidantes, en effet, les patients présentent à la fois une myotonie (difficulté à relâcher un muscle contracté) et une faiblesse musculaire conduisant

progressivement à la perte de la locomotion puis à la mort, due à un affaiblissement fatale des muscles respiratoires et cardiaque.

Ces maladies ont toutes un point commun : une anomalie de l'expression de l'ADN qui entraîne des altérations des muscles squelettiques et du cœur. La compréhension de l'expression de ces gènes mutés nous permettra donc de mieux comprendre, voire de traiter dans le futur, ce type de myopathies chez l'Homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes musculaires et cardiaques de ces maladies. De plus, la souris est un modèle de myopathies déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Les souris utilisées recevront un traitement voisin de la thérapie génique : des virus seront injectés dans les muscles afin d'apporter directement le gène muté responsable de la maladie. La moitié des animaux utilisés recevra le gène normal, ce qui correspondra à une condition « contrôle ». Il est à noter que l'injection de virus dans le muscle de souris pour étudier une maladie musculaire humaine a déjà été réalisée avec succès par notre équipe, nous permettant ainsi d'établir et de valider les paramètres expérimentaux (type et quantité de virus, muscle injecté, âge de la souris, etc.).

Raffinement :

Afin de limiter le stress induit par l'injection, cette dernière sera faite sous anesthésie générale. Au réveil et par la suite, aucun dommage particulier n'est attendu car le gène muté n'aura qu'un effet local sur un seul muscle (le tibialis anterior). Cependant, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, nos précédentes études ont permis d'avoir des résultats valides avec des groupes de 20 animaux. Ainsi, dans ce projet un total de 40 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les muscles prélevés pour éviter un doublon de cette procédure expérimentale. Enfin, dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous utiliserons la patte controlatérale de chaque souris comme contrôle.

384- Dans le monde occidental, les maladies cardiovasculaires sont responsables d'un grand nombre de décès. Le risque vasculaire est nettement augmenté chez les sujets atteints par le syndrome métabolique qui correspond à un état pathologique consécutif à une accumulation de facteurs génétiques et environnementaux qui prédisposent et aggravent le risque vasculaire, tels que surpoids, sédentarité, tabagisme, hypertension artérielle, dyslipidémie.

Depuis de nombreuses années, les firmes pharmaceutiques ont développé des classes de médicaments très efficaces telles que les Statines et les Fibrates pour lutter plus particulièrement contre les désordres du métabolisme des lipides, contribuant efficacement ainsi à la réduction du risque.

Parallèlement à ces médicaments on voit apparaître parmi les techniques de marketing des produits de l'industrie agroalimentaire, les allégations dites nutritionnelles ou santé qui font référence à des propriétés nutritionnelles bénéfiques des produits sur la santé. Appréciés des consommateurs soucieux de leur hygiène de vie, ceci représente un véritable atout pour l'industrie agro-alimentaire.

Selon les nouveaux textes européens, seuls les produits qui auront un certain profil nutritionnel pourront se prévaloir de ce type d'allégation.

L'Agence européenne de sécurité alimentaire (European Food Safety Authority, EFSA) a fait des recommandations à ce sujet à la Commission Européenne et les évaluations des effets sont nécessaires pour pouvoir les revendiquer.

Dans ce contexte, nous proposons de procéder à l'évaluation in vivo de produits naturels ou/et de leurs dérivés à l'aide de modèles animaux établis et validés de dyslipidémies, et d'illustrer les éventuels mécanismes d'action à l'aide de lignées transgéniques ou knock-out.

Ce projet fera appel uniquement à l'espèce souris, 3 lignées de souris différentes seront utilisées et un nombre de 480 unités devrait être engagé au cours des 2 années qui couvriront ce projet.

S'agissant de produits naturels et/ou issus de produits naturels ou biologiques, il a été nécessaire de procéder dans une première phase de sélection et à une évaluation in vitro qui a permis de valider le lien entre la cible suspectée et un des composants des extraits issus des produits biologiques à tester. Nous réduisons le nombre d'animaux utilisés à l'aide de cette phase stringente in vitro de sélection pour l'évaluation des effets métaboliques pour lesquels le recours à l'animal en tant qu'organisme vivant est indispensable. Le remplacement du modèle animal par une méthode alternative qui mimerait la complexité des voies métaboliques empruntées n'est pas possible dans ce cas.

Le modèle utilisé reproduit fidèlement une situation présente chez l'Homme, la dyslipidémie de type III, un effet observé dans ce modèle présage d'une réelle efficacité sur la cible, l'utilisation des autres modèles transgéniques chez lesquels est invalidée la voie métabolique envisagée permet d'apporter une preuve sur le mécanisme d'action du principe actif. Ceci venant renforcer les revendications de la demande d'autorisation de l'allégation de santé.

Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet sont de classe légère, elles sont de courte durée et réalisées dans les conditions les moins stressantes possibles pour les animaux, les effets métaboliques sont mesurés sur des prélèvements sanguins de petit volume.

Gardant à l'esprit ces 3 socles de l'expérimentation animale, nous respecterons la règle des 3R's.

385- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente système moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100000 habitants),

A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales; parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (SOD1). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point et reproduisent les principales caractéristiques et les symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs: les neurones moteurs supérieurs, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs inférieurs, situés dans la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques. Cette atteinte cellulaire conjointe représente l'un des éléments discriminant du diagnostic de la SLA.

Malgré cette description clinique précise, il est frappant de noter que les recherches précliniques se sont jusqu'à présent focalisées sur les neurones moteurs inférieurs, faisant des neurones moteurs supérieurs, et du cortex moteur en général, les « grands oubliés » de l'échiquier de la SLA. Face aux échecs répétés des essais thérapeutiques, la question du rôle des neurones moteurs supérieurs et autres neurones corticaux, dans le déclenchement et la progression de la SLA apparaît plus que jamais pertinente.

L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le dysfonctionnement et/ou la perte des neurones moteurs supérieurs et des neurones inhibiteurs corticaux au cours de la SLA. Plus spécifiquement, nous proposons de marquer les neurones moteurs supérieurs (chirurgicalement), et les interneurons inhibiteurs corticaux (génétiquement) de souris développant la SLA, les souris SOD1G86R, et de souris-contrôle sauvages, afin de pouvoir les purifier, à différent stade de la pathologie, et de réaliser une étude comparative de l'expression des gènes au cours de la maladie. Cette étude permettra de mettre en évidence les voies de signalisations qui contrôlent spécifiquement la perte ou le dysfonctionnement de populations neuronales corticales-clés de la physiopathologie de la SLA, afin d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Cette étude impliquera 150 souris sauvages, et 150 souris SOD1G86R, sur 2 ans.

Au delà de la SLA, ce projet innovant est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur. Orientée vers la découverte de nouveaux acteurs moléculaires et le développement de stratégies thérapeutiques alternatives, cette thématique de recherche originale a pour ambition d'offrir aux cliniciens et à leurs patients de nouvelles réponses et de nouveaux atouts thérapeutiques.

386- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente système moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100000 habitants),

A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales; parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (SOD1). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point et reproduisent les principales caractéristiques et les symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs: les neurones moteurs supérieurs, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs inférieurs, situés dans la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques. Cette atteinte cellulaire conjointe représente l'un des éléments discriminant du diagnostic de la SLA.

Malgré cette description clinique précise, il est frappant de noter que les recherches précliniques se sont jusqu'à présent focalisées sur les neurones moteurs inférieurs, faisant des neurones moteurs supérieurs, et du cortex moteur en général, les « grands oubliés » de l'échiquier de la SLA. Face aux échecs répétés des essais thérapeutiques, la question du rôle des neurones moteurs supérieurs et autres neurones corticaux, dans le déclenchement et la progression de la SLA apparaît plus que jamais pertinente.

L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le dysfonctionnement et/ou la perte des neurones moteurs supérieurs et des neurones inhibiteurs corticaux au cours de la SLA. Plus spécifiquement, nous proposons de marquer les neurones moteurs supérieurs (chirurgicalement), et les interneurons inhibiteurs corticaux (génétiquement) de souris développant la SLA, les souris SOD1G86R, et de souris-contrôle sauvages, afin de pouvoir les purifier, à différent stade de la pathologie, et de réaliser une étude comparative de l'expression des gènes au cours de la maladie. Cette étude permettra de mettre en évidence les voies de signalisations qui contrôlent spécifiquement la perte ou le dysfonctionnement de populations neuronales corticales-clés de la physiopathologie de la SLA, afin d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Cette étude impliquera 150 souris sauvages, et 150 souris SOD1G86R, sur 2 ans.

Au delà de la SLA, ce projet innovant est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur. Orientée vers la découverte de nouveaux acteurs moléculaires et le développement de stratégies thérapeutiques alternatives, cette thématique de recherche originale a pour ambition d'offrir aux cliniciens et à leurs patients de nouvelles réponses et de nouveaux atouts thérapeutiques.

387- Le glioblastome multiforme est une tumeur cérébrale agressive qui touche 2400 personnes par an en France, avec une survie moyenne de 12 à 15 mois. Les traitements actuels, associant chirurgie et radio/chimiothérapie, restent malheureusement non curatifs et souvent limités. Un des inconvénients majeurs dans ce mode de traitement est le manque de spécificité pour les cellules tumorales par rapport au tissu sain, d'où l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de cibler plus spécifiquement les cellules tumorales.

Le protocole proposé ici s'intègre dans un projet de développement d'une thérapeutique par combinaison d'un vecteur efficace, le liposome, d'une protéine pro-apoptotique pour déclencher la mort cellulaire des cellules cancéreuses, et d'un peptide de ciblage spécifique des cellules tumorales.

L'efficacité d'action des protéoliposomes a été contrôlée in vitro et in vivo sur des souris avec tumeur sous-cutanée. Sur ce modèle, 5 injections intrapéritonéales (une tous les 2 jours) de protéoliposomes permet une rémission totale des animaux. In vivo, le principal obstacle à un traitement répété efficace contre le glioblastome est la présence de la barrière hémato-encéphalique peu perméable aux macromolécules. La biodistribution chez les souris avec tumeurs sous-cutanées ont montrées qu'une faible partie des protéoliposomes passe cette barrière.

Il nous faut donc confirmer qu'en cas de tumeurs cérébrales ce passage, accentué par l'effet de ciblage du peptide, est suffisant pour obtenir une efficacité thérapeutique permettant d'envisager un traitement chez l'homme.

Ce protocole propose donc de traiter des souris avec tumeur intracérébrale par plusieurs injections de protéoliposomes en intrapéritonéale (facilité d'injection chez le petit animal, bonne diffusion dans le système circulatoire, modèle couramment utilisé pour ce type d'étude).

Trois groupes de souris sont prévus : un groupe contrôle traité avec des liposomes sans protéine active et deux groupes traités avec des liposomes contenant la protéine pro-apoptotique associée ou non au peptide de ciblage. La comparaison des groupes expérimentaux permettra d'estimer l'apport du peptide de ciblage sur le passage de la barrière hémato-encéphalique et l'efficacité thérapeutique.

Les souris implantées sous anesthésie avec une tumeur cérébrale seront traitées par 7 injections intrapéritonéales (une tous les 2 jours) de protéoliposomes.

Le groupe contrôle sera de 7 animaux.

Les deux groupes expérimentaux comprendront 14 souris:

- 7 souris seront euthanasiées 12 jours après la fin du traitement. Cela permettra d'évaluer l'efficacité thérapeutique par mesure des volumes tumoraux ;

- 7 souris seront suivies sur du long terme (jusqu'à 90 jours en respectant les points limites) pour évaluer l'efficacité à long terme du traitement (rémission totale ou temporaire).

Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été estimé en fonction des protocoles précédemment réalisés par le laboratoire (pour des résultats statistiquement exploitables) en tenant compte des risques inhérent au protocole (anesthésie et atteinte potentielle de point limite).

La chirurgie sera réalisée sous anesthésie et analgésie et sera suivie d'une isolation temporaire de l'animal et d'un traitement post-opératoire au Metacam durant 2 jours. L'euthanasie sera réalisée sous anesthésie.

Le protocole sera susceptible d'être reproduite une seconde fois, pour vérifier la reproductibilité de l'expérience et tester 2 lots différents de protéoliposomes

388- La formation du cerveau est particulièrement sensible aux stress environnementaux, avec des effets à long terme très coûteux sur le plan de la santé et sur les plans humain et économique. En particulier l'exposition à l'alcool au cours de la vie fœtale est une des premières causes non génétiques de retard mental (syndrome d'alcoolisation fœtale ou SAF). Notre laboratoire se situe exactement à la croisée de ces deux programmes puisque nous étudions des facteurs de réponse au stress (dont l'alcool) qui sont aussi impliqués dans le développement normal du cerveau.

Nous étudions l'effet de l'ingestion d'alcool par le souris femelle en gestation sur le développement du cerveau de ses embryons. Ce modèle murin, permet de comprendre les mécanismes biologiques responsables syndrome d'alcoolisation fœtale décrit chez l'homme. Nous analysons le rôle de ces facteurs sensibles au stress dans les variations d'expression de gènes qui jouent un rôle dans le développement du cerveau, en conditions contrôle et alcool – (puis ensuite de fièvre). Nous testons/testerons ces conditions sur des souris contrôles et sur deux lignées de souris dont pour chacune, un gène codant ces facteurs jouant un rôle important à la fois dans la réponse au stress de l'environnement et dans les programmes de développement embryonnaire a été inactivé. Ces lignées sont maintenues dans notre animalerie : l'inactivation des gènes ne leur cause pas de problème, leur effet étant très subtil dans les conditions de vie normales.

Pour l'effet de l'alcool :

Les femelles gestantes sont nourries avec une nourriture semi-solide alcoolisée (2% alcool pendant 8 à 11 jours). Ou alors, ces femelles gestantes ont une seule piqure intra-péritonéale avec une solution saline contrôle ou une solution d'alcool à 3g/kg (poids de la femelle).

Les femelles gestantes sont mises à mort et leurs embryons prélevés pour analyses à différents stades de développement. Parfois, nous allons jusqu'aux premiers jours après la naissance des souriceaux qui sont alors mis à mort et leurs cerveaux prélevés pour analyse. La femelle est ensuite aussi mise à mort.

Les procédures décrites ci-dessus sont légères, le traitement des animaux respecte la règle des 3 R (nous utilisons, à chaque fois que c'est possible des modèles de cultures cellulaires neurales ou fibroblastiques pour répondre aux différentes questions moléculaires dès que possible), et la mise à mort se fait dans les conditions décrites en annexe IV de la directive.

Estimation du nombre d'animaux pour le projet : environ 60 souris femelles gestantes par an – environ 100 souriceaux par an – et une dizaine de mâles adultes par an. Sur 5 ans. Soient au total 300 souris femelles gestantes et 500 souriceaux sur la durée du projet.

389- Le virus de Schmallenberg (SBV), identifié depuis novembre 2011 dans de nombreux pays européens, est responsable d'une nouvelle maladie émergente affectant les ruminants d'élevage (bovins, ovins et caprins) ainsi que les cervidés et les camélidés. La transmission vectorielle de cet Orthobunyavirus s'apparente (probablement) à celle de la fièvre catarrhale du mouton. Bien que l'infection des adultes n'induit pas ou transitoirement peu de symptômes (diarrhée et/ou diminution de la production de lait chez les vaches), le SBV est responsable de mortalités à la naissance, d'avortements et de malformations fœtales. Considérant la menace indubitable posée par ce nouveau virus en Europe en terme de santé animale, la Commission Européenne a décidé en juin 2012 de financer des projets de recherche liés au SBV, qui ont été proposés par un consortium incluant la France, la Belgique, l'Allemagne, les Pays-Bas et le Royaume-Uni (Décision d'exécution de la Commission 2012/349/UE). L'objectif global du programme de recherche du consortium est de fournir des données expérimentales sur la physiopathologie et le diagnostic des infections dues au SBV et qui seront pertinentes pour la mise en œuvre de futures législations européennes. Le projet présenté ici a été conçu par les partenaires français du consortium pour répondre aux questions concernant l'impact des infections à SBV sur la fertilité et le développement embryonnaire chez les caprins. En bref, nous envisageons d'effectuer une étude expérimentale dans laquelle nous allons infecter 60 chèvres au total à différents stades de gestation, avant ou après l'insémination artificielle (IA) ou au jour de l'IA. Les données expérimentales qui seront obtenues au cours de cette étude permettront de définir pour la première fois l'impact potentiel des infections à SBV sur différents paramètres de la fertilité des chèvres (c'est-à-dire l'ovulation, la qualité ovocytaire et l'implantation de l'embryon) et de déterminer les conséquences des infections à SBV pour la viabilité fœtale à des stades précoces de la gestation.

390- L'épilepsie-absence est une épilepsie non-convulsive affectant principalement les enfants et les adolescents. Cette épilepsie, d'origine génétique, se traduit par une perte de conscience associée à un arrêt comportemental. Les crises d'absence sont de courte durée (quelques secondes) mais surviennent très fréquemment (10 à 200 /jour). La plupart des jeunes patients souffrent de déficits de perception et de mémorisation. Ces déficits pourraient être dus non seulement aux fréquentes ruptures de contact avec l'environnement lors des crises pluriquotidiennes, mais aussi être dus à une détérioration des processus d'attention dans la région du cerveau à l'origine des crises. À l'aide de recherches originales et transversales réalisées chez l'homme et chez l'animal, nous chercherons à caractériser les conséquences sur les processus de perception sensorielle de la survenue des crises.

Chez l'enfant atteint d'épilepsie-absence (cohorte d'une vingtaine d'enfants), nous analyserons les réponses évoquées par des stimulations visuelles au cours et en dehors des crises. Nous les comparerons à celles obtenues chez des sujets sains conscients de la scène visuelle présentée. Parallèlement, nous explorerons, dans un modèle animal de la maladie présentant de très fortes homologies avec la pathologie humaine (le rat GAERS pour Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg), les mécanismes cellulaires à l'origine de ces altérations de la perception sensorielle. Les réponses sensorielles évoquées dans la région du cerveau initiant les crises d'épilepsie chez les GAERS seront comparées à celles obtenues chez des rats Wistar non-épileptiques. Chez l'animal, nous chercherons également à comprendre comment une région cérébrale saine peut se transformer au cours du temps en une région génératrice de crises d'épilepsie.

Nous estimons qu'environ 350 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet d'une durée de 5 ans. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous avons réalisé une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques. Enfin, un soin particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, la douleur ou le stress des animaux grâce à l'utilisation combinée d'anesthésiques et de myorelaxants.

391- Chaque neurone du cerveau possède des propriétés électriques endogènes qui leur permettent d'intégrer et d'analyser les informations exogènes (par exemple sensorielles) issues de l'environnement. Ces propriétés sont sous-tendues par des canaux ioniques particuliers présents dans la membrane des neurones. Par ailleurs, les neurones, regroupés en réseaux, communiquent entre eux via leurs connexions synaptiques. Cette communication entre les neurones est responsable d'un

flux d'activité synaptique permanent qui est présent au niveau de chaque neurone mais aussi au niveau du cerveau dans son ensemble. Ces activités synaptiques de fond déterminent l'état interne du cerveau à chaque instant. Comment les activités synaptiques de fond interagissent-elles avec les propriétés spécifiques des neurones individuels pour permettre une intégration, une perception et éventuellement une mémorisation appropriée des stimuli environnementaux ? Une exploration électrophysiologique des neurones individuels n'étant pas réalisable chez l'homme, les expériences seront menées in vivo chez le rongeur. Des enregistrements électroencéphalographiques couplés à des enregistrements des neurones individuels seront réalisés chez des rats (de souche Sprague-Dawley ou Wistar) placés dans différentes conditions d'anesthésie de façon à générer différents types d'activité synaptique de fond. Nous analyserons l'impact de ces différents types d'activité sur les propriétés intrinsèques des neurones ainsi que sur leur réactivité à des stimulations sensorielles. Nous estimons qu'environ 450 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet d'une durée de 5 ans. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous avons réalisé une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques. Un soin tout particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur ou du stress des animaux grâce à une surveillance constante des paramètres physiologiques et un protocole d'intervention spécifique (utilisation appropriée d'anesthésiques et myorelaxants) pour chaque indicateur de souffrance (sensibilité au pincement de la patte, réflexes musculaires, variation de température, variation de la fréquence cardiaque...).

Nos expériences permettront de décrire pour la première fois comment un stimulus cutané se propage dans les réseaux de neurones impliqués dans la maladie de Parkinson et quelle est sa capacité à générer des influx nerveux dans ces réseaux. L'aboutissement de cette recherche permettra de comprendre pourquoi la perception des informations sensorielles est affectée au cours de la maladie de Parkinson et devrait conduire à terme à des traitements ciblant spécifiquement les symptômes sensoriels de cette grave maladie neurologique.

L'aboutissement de ce projet devrait permettre de déterminer quels sont les paramètres qui gouvernent le degré de variabilité de réponse à des informations issues de notre environnement et de mieux comprendre en quoi notre état interne participe à notre représentation du monde extérieur.

392- La maladie de Parkinson est une maladie neuro-dégénérative provoquée par la disparition progressive de neurones libérant un médiateur chimique particulier : la dopamine. Le manque de dopamine provoque de graves modifications dans certains réseaux de neurones conduisant à un ensemble de troubles moteurs, incluant une lenteur du mouvement, un tremblement au repos et une rigidité musculaire. Les mécanismes de ces déficits moteurs ont été beaucoup étudiés et de grandes avancées ont été récemment réalisées. Cependant, la mort des neurones sécrétant la dopamine provoque fréquemment des symptômes non-moteurs, en particulier des troubles sensoriels tels que des déficits dans la sensibilité tactile, qui sont peu pris en charge bien qu'ils affectent grandement la qualité de vie des malades. Les mécanismes cérébraux responsables de ces troubles sensoriels restent inconnus à ce jour.

Notre projet consiste à découvrir les modifications qui surviennent dans les réseaux de neurones affectés par la perte de dopamine et qui pourraient être responsables des symptômes sensoriels. Notre stratégie de recherche est d'utiliser un modèle animal bien établi de la maladie de Parkinson, le rat dont les neurones fabriquant la dopamine ont été expérimentalement supprimés. Après avoir réalisé des expériences préliminaires chez le rat sain décrivant comment les neurones impliqués dans la maladie de Parkinson traitent les stimuli sensoriels, nous analyserons comment ces mêmes neurones intègrent les informations sensorielles chez le rat parkinsonien. 100 rats parkinsoniens et 50 rats contrôles (Sprague-Dawley) seront nécessaires pour mener à bien ce projet d'une durée de 3 ans. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet, nous avons réalisé une planification rigoureuse des expériences en testant préalablement la faisabilité des expériences, en combinant différents protocoles au cours d'une même expérience et en réalisant une exploitation maximale des données à l'aide de l'utilisation appropriée de tests statistiques. Un soin tout particulier sera apporté à la réduction de l'inconfort, de la douleur ou du stress des animaux grâce à une surveillance constante des paramètres physiologiques et un protocole d'intervention spécifique (utilisation appropriée d'anesthésiques et myorelaxants) pour chaque indicateur de souffrance (sensibilité au pincement de la patte, réflexes musculaires, variation de température, variation de la fréquence cardiaque...).

Nos expériences permettront de décrire pour la première fois comment un stimulus cutané se propage dans les réseaux de neurones impliqués dans la maladie de Parkinson et quelle est sa capacité à générer des influx nerveux dans ces réseaux. L'aboutissement de cette recherche permettra de comprendre pourquoi la perception des informations sensorielles est affectée au cours de la maladie de Parkinson et devrait conduire à terme à des traitements ciblant spécifiquement les symptômes sensoriels de cette grave maladie neurologique.

393- L'augmentation endémique de la prévalence et de l'incidence du diabète de type 2 (DT2) ainsi que l'obésité ne se dément pas. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde. En 2004, le diabète a tué près de 3,5 millions de personnes et le même organisme évalue que le nombre de décès par diabète va doubler entre 2005 et 2030. Un autre élément, peut-être encore plus préoccupant et qui signe la gravité du problème, est l'apparition du DT2 chez l'enfant et l'adolescent, phénomène anecdotique, voire totalement inconnu, il y a une vingtaine

d'années. On attribue classiquement cette véritable explosion de la maladie au style de vie occidental. Le DT2 est une maladie multifactorielle, résultant de l'interaction entre des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs d'environnement (obésité, sédentarité, surnutrition ...). Sur le plan génétique, il s'agit d'une maladie polygénique et multigénique (les gènes de prédisposition ne sont pas les mêmes d'un groupe d'individus à l'autre), sans qu'aucun gène majeur n'ait été identifié à ce jour, en tout cas pour les formes courantes de la maladie. La physiopathologie du DT2 peut schématiquement être résumée à deux anomalies interdépendantes: la diminution de la sensibilité des tissus-cibles (foie, tissu adipeux blanc, muscle squelettique) aux effets de l'insuline et à une détérioration progressive de la masse anatomique et de la fonction de la cellule β du pancréas endocrine, siège de la production d'insuline.

Du fait du caractère polygénique de la maladie chez l'homme, les modèles animaux utilisés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements médicamenteux miment différentes facettes de la maladie; il peut s'agir de modèles présentant une hyperglycémie et/ou une obésité et/ou une insulino-résistance, choisis en fonction du mécanisme d'action présumé du produit à tester et donc de la cible pharmacologique.

En particulier, pour la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme, les modèles animaux le plus couramment utilisés, et se rapprochant du diabète de type 2, sont des souris transgéniques ou mutantes.

Ces études d'efficacité à long terme réalisées in vivo ne sont entreprises qu'après avoir étudié le profil pharmacocinétique des produits à tester, avoir prouvé une sélectivité cible-dépendante, ainsi qu'une efficacité dans des tests cellulaires in vitro. L'effet à long terme sur le métabolisme glucidique et lipidique ne peut être évalué qu'après un traitement chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la physiologie qui intègre toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode substitutive.

Les animaux sont hébergés en groupe tout au long de l'expérimentation et leur environnement est enrichi d'un bâtonnet en bois et/ou d'un tube cartonné, favorisant les comportements de fouissage, exploration et nidification.

Les techniques d'imagerie non invasives sont utilisées en priorité chez le petit animal (quantification du tissu adipeux)

On estime à environ 120 le nombre d'animaux par étude et on suppose pouvoir réaliser 5 études par an (soit sur 5 ans environ 3000 animaux).

394- L'hémophilie de type A est une maladie génétique rare liée au chromosome X qui se caractérise par une déficience en facteur de coagulation VIII (FVIII). Les manifestations cliniques correspondent aux hémorragies qui peuvent atteindre chaque organe, en particulier les articulations et les muscles.

Le traitement de cette hémophilie consiste à injecter un FVIII de substitution : soit d'origine synthétique ou soit dérivé de plasma humain. Cependant, du fait des nombreuses injections réalisées tout au long de la vie des patients, 30 à 40% d'entre eux développent des anticorps neutralisants et ce quel que soit l'origine du FVIII utilisé, conduisant à l'inefficacité du traitement.

Les travaux réalisés dans ce projet permettront l'évaluation d'une stratégie d'induction de tolérance (IDT) vis-à-vis d'un FVIII recombinant (FVIIIr) afin de pouvoir traiter les patients à risque avant le début de la thérapie afin qu'ils ne développent pas de réaction immunitaire ou de pouvoir réintroduire cette molécule chez des patients ayant développés des inhibiteurs. Ces études permettront l'évaluation de l'induction de tolérance (IDT) obtenue avec des globules rouges chargés en FVIII dans un modèle murin sain et d'identifier les mécanismes impliqués avant de tester notre approche chez des souris atteintes d'hémophilie A (souris génétiquement modifiées).

Le nombre d'animaux utilisés dans ces études est le minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Aucune méthode alternative ne permet le remplacement des animaux utilisés, car il s'agit d'une étude d'effets sur le système immunitaire global.

La voie d'administration intraveineuse a été retenue car il s'agit de celle utilisée chez l'Homme pour les globules rouges et pour les facteurs de coagulation. Aucun effet secondaire n'est attendu suite aux injections, mais les animaux seront surveillés durant 1 à 2h suivant cet acte, puis observés tous les jours, et pesés régulièrement.

Les procédures exécutées ne provoqueront qu'un inconfort passager (injections intraveineuses et prélèvement de sang) et ne nécessiteront qu'une contention légère. A la fin des protocoles expérimentaux, divers organes tels que le foie et la rate pourront être prélevés sur les animaux qui auront été euthanasiés après une anesthésie profonde.

Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis. Les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition: blocs à ronger, litière papier pour la confection de nids

Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il sera examiné par un vétérinaire, et si nécessaire anesthésié puis euthanasié.

Le principal bénéfice attendu de ces études est l'obtention de données satisfaisantes démontrant l'efficacité de l'induction de tolérance par les globules rouges chargés chez la souris saine, données indispensables pour pouvoir ensuite tester cette thérapie chez la souris malade, avant d'appliquer le traitement à l'humain.

395- Les plaquettes sanguines, formées dans la moelle osseuse, jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies.

L'activation des plaquettes s'accompagne de la sécrétion de leurs granules qui contiennent de nombreuses protéines essentielles pour leurs fonctions. Des maladies humaines résultant d'une anomalie des granules sont associées à un risque

hémorragique. La formation des différents granules plaquettaires fait intervenir des protéines Rab32 et 38, impliquées dans le trafic vésiculaire intracellulaire. L'utilisation de souris dont les gènes Rab38 ou Rab32 aura été inactivé est indispensable pour l'étude de la fonction de ces protéines au cours de la formation des granules et dans les fonctions plaquettaires, étant donné que la production de plaquettes en culture in vitro n'est pas techniquement possible actuellement. Ces souris nous permettront d'une part de visualiser in situ, au sein de la moelle osseuse, l'aspect des différents granules grâce à la microscopie électronique et confocale. D'autre part, le prélèvement de sang à partir des souris dépourvues de ces protéines nous permettra de comprendre l'importance des Rab32/38 dans la fonctionnalité des plaquettes sanguines. Sur l'ensemble du projet, d'une durée de 5 ans, nous ferons appel à 321 souris de chaque génotype et leur contrôle, soit un total de 1906 souris, ainsi qu'à 744 autres souris dites sauvages pour les expériences de greffe de moelle osseuse. Ce travail apportera des connaissances concernant un mécanisme essentiel pour la fonction des plaquettes, avec en perspective d'une part un meilleur diagnostic des patients présentant des hémorragies d'origine inconnue, et un traitement éventuel, et d'autre part l'utilisation des granules plaquettaires comme moyen de transport pour véhiculer des médicaments, par exemple pour soigner les hémophiles ou empêcher les récurrences de thrombose artérielle ou veineuse.

396- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Ils peuvent donc entraîner des effets secondaires aussi bien locaux que généraux. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique. Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Il s'agit dans ce projet d'évaluer la pharmacocinétique (évaluation du devenir du produit dans l'organisme par dosage du produit et de ses métabolites) et/ou la pharmacodynamie de produits de santé (évaluation de l'effet du produit sur l'organisme par vérification des constantes biologiques). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de les évaluer sur des modèles animaux, les rongeurs, lagomorphes et porcins sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes physiologiques reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 800 rats, 500 porcins, 300 lapins et 250 chiens. Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes et porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin

397- De nombreux candidats médicaments développés dans le cadre du labex Immuno Graft Oncology (Nantes) sont des anticorps monoclonaux présentant une réactivité limitée aux primates (hommes et primates non-humains). Avant leur évaluation clinique, ces molécules doivent être évaluées in vitro et in vivo, classiquement chez des primates non-humains. Ces essais peuvent néanmoins être remplacés dans certains cas par l'utilisation de souris dites "humanisées". Il s'agit de souris reconstituées avec des cellules hématopoïétiques humaines (originaires de la moelle ou du sang). In vivo, la réponse des cellules immunitaires humaines peut alors être étudiée en absence ou en présence d'une stimulation antigénique ou d'une greffe de tissu humain. Ce modèle représente une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique.

Notre laboratoire veut ainsi développer une technique de reconstitution de souris immunodéficientes par des cellules immunitaires humaines permettant l'étude des mécanismes impliqués dans la réponse immune à la transplantation. Ces modèles seront utilisés pour analyser l'effet immunomodulateur d'antagonistes de la co-stimulation lymphocytaire ayant comme finalité la découverte de nouvelles thérapies actives sur le système immunitaire humain. Ces molécules présentent la capacité d'inhiber sélectivement les lymphocytes T et B effecteurs humains tout en maintenant l'activité des lymphocytes régulateurs, qui sont nécessaires à l'acquisition d'une tolérance immunologique

398- L'hépatocarcinome est un cancer primitif du foie et correspond à la 5ème cause de cancer dans le monde. Il survient dans la quasi-totalité des cas sur un foie anormal, fréquemment atteint de maladie chronique de type cirrhose. Les infections par les virus de l'hépatite B et C sont l'un des principaux facteurs responsables du développement de ce type de tumeurs au niveau du foie. Bien que les défauts génétiques caractéristiques des hépatocarcinomes soient très bien caractérisés, les événements précoces de la maladie restent peu connus.

Les protéines TRIM24 et TRIM33 appartiennent à une famille comportant un motif tripartite (TRIM). Les souris Trim24^{-/-} développent spontanément des hépatocarcinomes avec une pénétrance totale, un phénotype dont la cinétique est fortement accélérée dans les souris double mutantes Trim24^{-/-}::Trim33^{hep}^{-/-}. TRIM24 et TRIM33 agissent donc en synergie comme supprimeurs de tumeur dans l'hépatocarcinome chez la souris, et comme co-facteurs transcriptionnels qui répriment l'action oncogénique des récepteurs à l'acide rétinoïque. Les différentes étapes du développement de l'hépatocarcinome chez les souris Trim24^{-/-} et Trim24^{-/-}::Trim33^{hep}^{-/-} sont bien établies au niveau tant cellulaire qu'histopathologique.

Le projet proposé vise à exprimer la forme sauvage et 6 formes mutées des domaines fonctionnels de la protéine TRIM24 dans le foie des souris Trim24^{-/-} et Trim24^{-/-}::Trim33^{hep}^{-/-} pour étudier la capacité de TRIM24 et de ces mutants à supprimer l'hépatocarcinome et à restaurer la régulation transcriptionnelle des gènes dérégulés. Ces expériences seront également réalisées dans des cultures d'hépatocytes mais les résultats ne reflèteront que partiellement la situation in vivo dans un foie de souris. Les souris Trim24^{-/-} et Trim24^{-/-}::Trim33^{hep}^{-/-} représentent donc un modèle expérimental unique pour comprendre les mécanismes d'initiation de la tumorigenèse ainsi que pour des approches préventives et thérapeutiques. En particulier, ce modèle ne nécessite pas d'intervention extérieure, comme des traitements chimiques pour induire le cancer, est associé à une très haute et reproductible incidence de l'hépatocarcinome, est strictement limité aux cellules du foie. De plus, le phénotype observé chez les souris Trim24 et Trim33 mutantes ressemble à un état inflammatoire chronique qui caractérise l'hépatocarcinome humain.

L'ensemble du projet devrait nécessiter environ 400 souris, la plupart étant produites pour obtenir les souris expérimentales avec le génotype nécessaire, soit environ 250 souris. En fonction des génotypes obtenus, nous tenterons de réduire ce nombre au maximum. Le nombre de souris expérimentales est de moins de 150, mais est incompressible du fait de la nécessité de résultats statistiques. Les souris utilisées pour les croisements ne seront soumises à aucune douleur et les souris expérimentales, en cas de douleur, et si la mise à mort doit être reportée, seront traitées avec un antidouleur en fonction du degré de douleur. En cas de douleur trop importante, les souris seront mises à mort.

399- CD146 est une protéine d'adhésion de la jonction endothéliale et est impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contrôlant notamment l'infiltration de produits sanguins dans les tissus sous-jacents. Cependant, son rôle dans le recrutement inflammatoire n'est pas élucidé à ce jour. C'est pourquoi nous proposons d'étudier le rôle de CD146 dans l'inflammation et les pathologies associées telles que le développement de la plaque d'athérosclérose et les maladies inflammatoires rénales, grâce à un modèle de souris invalidée constitutivement pour le gène CD146, modèle généré dans notre laboratoire. L'espèce animale utilisée sera la souris car la meilleure façon d'étudier les fonctions d'une molécule dans un contexte physiologique puis pathologique est de l'analyser in vivo à travers la physiopathologie animale. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R-Réduction/Remplacement/Raffinement » sera appliquée.

Ainsi, une expérience pilote sera réalisée sur 6 animaux (3 animaux sauvages et 3 animaux déficients en CD146) pour chaque protocole. Puis, nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques dans une seconde série d'expériences selon la méthode statistique pour le calcul d'effectif, soit un total de 252 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence.

400- L'accroissement de la masse musculaire résulte de la balance positive entre synthèse et dégradation protéique. Ces deux processus sont finement régulés par différents facteurs nutritionnels incluant acides aminés, hormones et micronutriments, et peuvent être influencés par le statut physiopathologique. Par exemple, le vieillissement et l'obésité sont caractérisés par une fonte musculaire. L'obésité peut entraîner une fonte accentuée des muscles squelettiques masquée par l'accumulation de différents lipides (triglycérides, diglycérides, céramides) au sein de ces derniers. Cette accumulation ectopique de lipides au sein de tissus autres que le tissu adipeux participe à la perte de sensibilité à l'insuline des tissus concernés. Cette infiltration lipidique du tissu musculaire entraîne un défaut de synthèse protéique en réponse à divers stimuli nutritionnels. L'une des voies de signalisation majeures impliquées dans la régulation de la synthèse protéique musculaire est la voie mTOR (mammalian target of rapamycin), dont le rôle principal est de contrôler l'initiation de la traduction des ARNm, étape limitante dans la synthèse protéique, en réponse aux stimuli nutritionnels. L'activation ou l'inhibition de cette étape se fait via les protéines 4EBP1 et 4EBP2, dont l'activité est contrôlée par la voie mTOR, et dont la fonction est d'inhiber la synthèse protéique en absence de stimuli.

L'objectif spécifique de cette étude in vivo est de mesurer l'impact de la délétion des protéines 4EBP1 et 4EBP2 sur la synthèse protéique musculaire dans un contexte d'obésité.

Des études ont montré que la délétion de ces protéines accélérât le développement de l'obésité chez la souris soumise à un régime hyperlipidique, et stimulait la synthèse protéique de cellules en culture. Notre hypothèse est que la délétion de ces protéines permet le maintien de la synthèse protéique musculaire et protège en partie le muscle des altérations induites par l'obésité en favorisant l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux. Pour répondre à l'objectif de notre étude, nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas les protéines 4EBP1 et 4EBP2 (4EBP1/2 DKO). Les souris mâles adultes seront séparées en 2 groupes distincts (sauvages et 4EBP1/2 DKO) et soumises soit à un régime contrôle soit à un régime riche en graisse, soit à un régime riche en graisses et en sucres pendant 16 semaines. A la fin de ce régime, 20 animaux par groupes seront abattus : 10 animaux à jeun et 10 animaux en période postprandiale. Nous comparerons les mesures effectuées durant les phases pré- et postprandiales, puisque de nombreux travaux démontrent que la synthèse protéique musculaire est principalement altérée en phase post-prandiale, et proviendrait d'un défaut de réponse à l'action anabolique des nutriments et hormones associés à la prise alimentaire. L'ensemble des résultats obtenus nous permettra de mesurer l'impact d'une dérégulation ciblée de la voie mTOR (délétion des protéines 4EBP1/2) sur le métabolisme protéique musculaire.