



**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 (3)

201- L'étude de la régulation de la masse musculaire est un champ d'investigation important de part les nombreuses situations pathologiques conduisant à une perte de masse musculaire (atrophie) et/ou une perte de force musculaire (faiblesse) : maladies cardiaque et rénale chroniques, vieillissement, cancer, myopathies, choc septique ...

L'altération de ces paramètres contribue à une perte de fonction du muscle et altère de façon ultime la qualité de vie voire le pronostic des patients. Les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la masse musculaire, sur le versant de l'hypertrophie ou de l'atrophie, bien qu'ils soient largement explorés ne permettent pas d'expliquer le phénotype musculaire de toutes les pathologies. Il apparaît donc nécessaire de déterminer au cas par cas les processus physiopathologiques conduisant à l'altération de la fonction musculaire.

La cachexie cancéreuse est un syndrome regroupant plusieurs symptômes, caractérisé notamment par une perte de poids du corps dramatique. Celle-ci résulte principalement d'une perte de masse musculaire et adipeuse dramatique. De façon ultime, la cachexie liée au cancer réduit la qualité et la durée de vie des patients et peut diminuer l'efficacité des traitements.

En 1997, l'équipe de McPherron a identifié le facteur de croissance appelé Myostatine (Mstn) comme régulateur négatif majeur de la masse musculaire. En effet, son niveau d'expression est augmenté au cours de processus d'atrophie musculaire (vieillissement, VIH, cancer, ...). A l'inverse, des animaux invalidés pour l'expression de la Mstn sont caractérisés par une augmentation considérable de la masse musculaire (souris Mstn<sup>-/-</sup>, hypermusclée). Des stratégies thérapeutiques basées sur le blocage de l'activité de la Mstn ont déjà démontré leur efficacité dans certaines situations conduisant à une atrophie musculaire. Par exemple, dans des souris modèle pour la myopathie de Duchenne, ou des souris porteuses d'un cancer, le blocage de la voie de signalisation de la Mstn a permis de prévenir l'atrophie voire d'augmenter la masse musculaire des souris atteintes.

Dans ce contexte, le but de ce projet est de démontrer la pertinence du blocage de l'action de la Mstn comme stratégie thérapeutique dans le contexte de la cachexie liée au cancer. Pour cela des animaux transgéniques générés par le croisement de souris développant spontanément un cancer de type colorectal (souris APC Min<sup>+/+</sup>) et de souris Mstn<sup>-/-</sup> seront étudiées. Les retombées de ce projet permettront d'une part de mieux connaître les mécanismes responsables de l'atrophie musculaire liée au cancer et de déterminer si la préexistence d'un capital musculaire élevé présage d'une meilleure tolérance au développement du cancer et améliore la durée de vie des souris atteintes.

Une approche pharmacologique sera également étudiée en administrant aux souris cancéreuses un anticorps dirigé contre la Mstn inhibant ainsi son action. Cette démarche s'inscrit complètement dans l'étude d'une stratégie thérapeutique qui pourrait être transposée aux patients.

202- Actuellement, les éleveurs de porcs castrant et coupent la queue de la plupart des porcelets. Ces interventions douloureuses sont réalisées avant 8 j d'âge en conformité avec la législation. Sachant que le porc est élevé pour la consommation humaine de viande, les traitements médicamenteux sont très réglementés et le nombre de molécules utilisables pour traiter la douleur est très limité. Parmi elles, le butorphanol dérivé opioïde qui a des propriétés analgésiques et légèrement sédatives pourrait être utilisé, sous réserve d'être prescrit par un vétérinaire. Cette expérience est la première phase d'un projet plus vaste destiné à tester l'intérêt du butorphanol pour réduire la douleur liée à la coupe de queue (caudectomie) couplée ou non à la castration chez le porc. Compte tenu du peu d'informations existantes chez le porc, il est nécessaire de réaliser un essai préliminaire sur quelques portées afin de préciser la dose à utiliser et l'absence d'effets secondaires du traitement, notamment un effet sédatif qui serait préjudiciable à la survie du porcelet (risque d'écrasement par la truie). Les mesures concerneront la croissance et le comportement des porcelets.

Au total 48 porcelets seront mis en expérience. Sachant que le projet porte sur l'évaluation de la douleur ressentie par les animaux, il n'est pas possible de mettre en place de méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants. Le protocole ne prévoit pas de mise à mort des animaux à des fins expérimentales pour réaliser des prélèvements de tissus ou d'organes. Les animaux seront répartis au sein de chaque portée en 6 groupes expérimentaux.

Quatre groupes de porcs seront castrés et recevront un placebo (serum physiologique) ou l'une des trois doses de butorphanol. Les 2 autres groupes ne seront pas castrés et recevront le placebo ou la dose la plus élevée de butorphanol. La comparaison entre les groupes expérimentaux se fera intra-portée de façon à limiter la variabilité entre traitements et augmenter la

puissance statistique de l'expérience. Pour certains paramètres, comme la vitesse de croissance, l'analyse sera également réalisée intra animal grâce à des mesures avant et après l'intervention douloureuse, ce qui augmente encore la puissance statistique. Il y aura donc 8 animaux par groupe expérimental ce qui est un minimum pour définir la dose optimale d'un traitement pharmacologique pour réduire la douleur tout en vérifiant l'absence d'effets pervers évidents sur le comportement et la croissance des porcelets.

Deux types de procédures expérimentales seront appliqués sur les animaux: des injections intramusculaires (induction de douleurs légères) et la castration chirurgicale des porcelets (induction de douleurs modérées). Tous les animaux soumis à la castration chirurgicale recevront du meloxicam qui permet de réduire la douleur postopératoire.

Ces procédures seront réalisées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité. La méthode employée (incision des bourses et coupure du cordon spermatique) pour la castration chirurgicale est similaire à celle pratiquée en routine dans les élevages de porcs commerciaux.

203- Les lésions nerveuses peuvent entraîner des douleurs persistantes dont le traitement est actuellement très décevant. Les mécanismes d'installation et de maintien de ces douleurs sont complexes à différents niveaux du système nerveux périphérique et central. Il est maintenant clair que les cellules nerveuses ne sont pas les seuls acteurs de ces changements. Les cellules gliales, les cellules endothéliales et les cellules immunocompétentes que l'on peut regrouper sous le terme d'unités neurovasculaires étendues (UNVE) forment un ensemble fonctionnel dont l'étude des interactions peut se révéler décisif dans la compréhension des mécanismes douloureux.

Le but de ce projet est donc de modéliser ces interactions, par une double approche in vitro et in vivo.

L'approche in vitro consistera à tester sur des cultures cellulaires les voies de signalisation cellulaires et molécules susceptibles d'intervenir dans ces interactions. L'approche in vivo consistera à vérifier sur organisme entier les données obtenues in vitro.

Une lésion nerveuse sera effectuée afin de pouvoir engendrer des changements tissulaires conduisant à des douleurs neuropathiques. Une fois la lésion effectuée, des prélèvements tissulaires seront effectués afin d'identifier/mesurer les changements via des molécules d'intérêt. Des molécules susceptibles d'interférer avec ces voies de signalisation cellulaire seront utilisées afin de tenter de renverser les effets pathologiques de la lésion. Les études seront conduites chez le rat. Un total de 200 animaux (100 pour les cultures cellulaires et 100 pour l'approche in vivo) est prévu.

Les données expérimentales seront analysées très régulièrement afin de pouvoir détecter le plus précocement possible les résultats statistiquement significatifs et limiter ainsi dans chaque sous-groupe expérimental le nombre d'animaux au minimum. Les résultats de cultures cellulaires permettront également de tester les voies de signalisation cellulaire pertinentes et de ne tester in vivo que les résultats probants.

204- La maladie de Pompe est une maladie génétique rare due à un déficit total ou partiel d'une enzyme lysosomale: l'acide  $\alpha$ -glucosidase (GAA). Actuellement, un seul traitement est disponible sur le marché et consiste en l'injection d'une enzyme recombinante substitutive de la GAA déficiente: l'alpha-glucosidase- $\alpha$  commercialisée sous le nom de Myozyme<sup>®</sup>. Cependant, les doses utilisées et les nombreuses injections réalisées tout au long de la vie du patient déclenchent dans 90% des cas une réaction immunitaire menant dans les cas les plus graves à l'inefficacité du produit et la mort du patient.

Les travaux réalisés dans ce projet permettront l'évaluation d'une stratégie d'induction de tolérance (IDT) vis-à-vis de cette protéine thérapeutique 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 allergiques.

Les études permettront l'évaluation de l'induction de tolérance (IDT) obtenue avec des globules rouges chargés en molécule thérapeutique dans des modèles murins sains et atteints de la maladie de Pompe (souris génétiquement modifiées). Les études sur les souris saines ont déjà été initiées et celles à venir vont nous permettre de confirmer nos premières données avant le passage sur souris malades.

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 l'alpha-glucosidase- $\alpha$ . 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 les muscles striés et le foie 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 malade, données indispensables pour pouvoir développer cette thérapie chez l'homme.

205- Les infections respiratoires restent un problème important de santé publique. Nous nous intéressons aux infections virale (virus influenza ou virus grippal) et bactérienne (*Streptococcus pneumoniae* ou pneumocoque), deux pathogènes majeurs chez l'homme. Notre objectif est de mieux comprendre le rôle du système immunitaire inné dans les mécanismes de défense et dans la pathogenèse liés à ces infections. In fine, notre objectif est de proposer de nouvelles méthodes prophylactiques ou thérapeutiques permettant de mieux contrôler ces infections.

A l'heure actuelle, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques de l'infection par le virus grippal et le pneumocoque. Il est clairement admis par la communauté scientifique que le modèle expérimental de la souris est pertinent. Des souris C57BL/6 (mâles, 8 semaines) seront utilisées dans ce projet.

Chez les souris (co)-infectées, nous analyserons :

1. Le recrutement, l'état d'activation et la fonction des cellules immunes, particulièrement celles appartenant au système immunitaire inné, dans le poumon et la rate (cytométrie, culture cellulaire). L'inflammation pulmonaire sera aussi mesurée.
2. Le rôle de certaines populations cellulaires et cytokines dans les mécanismes de défense et de pathogenèse.
3. L'effet du traitement par des immunostimulants ou des immunorégulateurs sur les mécanismes de défense et la régulation de la pathologie.
4. L'efficacité d'une formulation vaccinale dirigée contre le pneumocoque.

Nous nous concentrerons particulièrement sur l'étude de deux populations de lymphocytes T «innés», à savoir les lymphocytes T Natural Killer invariant (iNKT) et les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Parmi les stratégies qui seront développées, nous comparerons le phénotype des souris sauvages (immunocompétentes) à celui des souris déficientes dans l'une de ces deux populations cellulaires.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, environ 3300 souris seront nécessaires pour atteindre nos objectifs (projet sur 5 ans, 5 chercheurs statutaires). Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Les animaux sont manipulés individuellement afin de limiter tout stress des animaux non manipulés. Les souris ne sont pas soumises à des prélèvements répétitifs. Une anesthésie est pratiquée avant l'infection. Une surveillance quotidienne est effectuée afin de détecter le plus tôt possible une éventuelle morbidité. En cas de signes cliniques défavorables (prostration, vocalisation, tremblement, aspect des poils) et/ou si une perte de poids supérieure à 20 % survenait, nous procéderons immédiatement à la mise à mort des animaux.

206- La fibrillation atriale est l'arythmie cardiaque la plus fréquemment rencontrée en pratique clinique humaine. Sa principale complication est l'accident vasculaire cérébral d'origine cardio-embolique. Le vieillissement et l'hypertension artérielle sont les facteurs de risque les plus fréquemment associés à l'arythmogénicité atriale. Il est suspecté qu'une sous expression du gène codant pour la protéine Pitx2 (paired-like homeodomain transcription factor 2) pourrait être un des mécanismes moléculaires de la fibrillation atriale chez l'homme.

Il existe une lignée de rats spontanément hypertendus (SHR) reconnue comme un bon modèle pour étudier les mécanismes et les complications de l'hypertension artérielle.

Nous avons montré récemment que les rats SHR présentent en vieillissant des arythmies atriales semblables à celles rencontrées chez l'Homme. Chez le rat, nous souhaitons mesurer l'expression du gène Pitx2 afin d'évaluer son influence sur le développement de la fibrillation atriale.

Notre projet consiste à effectuer des enregistrements électrocardiographiques chez des rats âgés, des lignées SHR et WKY (contrôle normotendu), et à analyser la modulation des arythmies atriales par le degré d'expression et de méthylation (qui peut conduire à une diminution de la transcription) du gène Pitx2. Il sera ensuite envisagé d'utiliser des agents hypométhylants afin d'évaluer le rétablissement d'une activité atriale normale.

Les enregistrements électrocardiographiques sont réalisés par télémétrie chez des animaux hébergés en conditions normales, en l'absence de tout stress. La qualité et la quantité des données recueillies durant de longues périodes permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés

207- La mesure des variations de température des animaux de rente est un facteur d'intérêt pour la détection du moment d'ovulation, du déclenchement de la parturition et de la reprise du cycle sexuel pendant la lactation (chaleurs de lait). De plus, le suivi continu de la température d'un individu permet une détection précoce de tout autre problème d'origine sanitaire ou pathologique.

L'objectif de ce projet est de valider un nouveau dispositif hautement sensible de mesure de la température sous-cutanée et d'enregistrer les variations de température de 40 juments en continu pendant 3 mois afin de relier ces mesures avec l'état physiologique des animaux au cours de cycles sexuels normaux et au cours de la dernière partie de la gestation.

208- L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* dans un modèle de stase veineuse expérimentale chez le lapin (méthode de Wessler), l'activité thrombogène de médicaments. Cette évaluation s'effectue pour les produits en développement avant leurs mises sur le marché ou, pour les médicaments commercialisés, dans le cadre du traitement d'écart de production susceptibles d'impacter la sécurité du lot. Les essais sont souvent réalisés dans un cadre réglementaire et les résultats participent à la décision de libérer un lot sur le marché. Aucune autre méthode de remplacement *in vitro* reconnue par les autorités n'existe actuellement.

Cette méthode, basée sur celle décrite par Wessler and al. (1959), consiste à administrer par voie intraveineuse le produit chez le lapin hybride néozélandais anesthésié et à observer la présence ou l'absence de thrombus au niveau des veines jugulaires (suivant un système de cotation) afin de déterminer une dose thrombogène. Pour chaque produit testé, 8 lapins minimum sont nécessaires (5 pour le produit, 1 pour le témoin positif, 1 pour le témoin négatif et 1 en cas d'incident). En moyenne, 1 à 3 doses sont testées par produit. 5 animaux par dose est le nombre minimal et suffisant pour obtenir une robustesse des résultats. Ce nombre a été déterminé en analysant les données historiques obtenues au sein de notre laboratoire sur plus de 25 ans. Par produit, 8 lapins à 18 lapins sont utilisés, avec une estimation de 6 produits analysés par an ce qui représente 144 à 324 lapins sur 3 ans.

209- L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* le pouvoir hypotensif de médicaments. Les médicaments à tester sont des protéines humaines (albumine, immunoglobulines et facteurs de la coagulation) purifiées à partir du plasma humain et utilisées chez l'homme dans différentes indications (réanimation, déficiences congénitales, etc.). Cette évaluation s'effectue dans le cadre du traitement d'écarts de production susceptibles d'impacter la sécurité du lot (action hypotensive non souhaitée). Les essais sont réalisés dans un cadre réglementaire et les résultats participent à la décision de libérer un lot sur le marché.

L'évaluation du pouvoir hypotensif est déterminée par la mesure de la pression artérielle avant et après injection par voie intraveineuse du médicament chez le rat. La mesure de cette pression artérielle est réalisée à l'aide d'un capteur placé au niveau de la carotide de l'animal et relié à l'appareil enregistreur. Ces études ont donc pour objet de vérifier qu'un médicament n'a pas d'effet hypotensif.

Ce contrôle est effectué chez le rat OFA Sprague-Dawley anesthésié. Chaque médicament est testé sur 6 rats (5 animaux pour le produit et 1 animal témoin) plus un animal supplémentaire en cas d'incident.

Une étude comprend 7 rats, avec une estimation de 3 études par an ce qui représente 21 rats sur une année et 63 rats sur 3 ans

210- L'insuffisance cardiaque est une pathologie sévère caractérisée par une incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe et à irriguer correctement les organes périphériques. Cette déficience est due notamment à une diminution des capacités bioénergétiques du muscle cardiaque. Nous étudions une enzyme présente dans les muscles et le cœur et impliquée dans la voie de biosynthèse du NAD, une molécule essentielle pour le métabolisme énergétique. Nous avons identifié le gène codant cette enzyme comme fortement activé dans des pathologies cardiaque sévères appelées cardiomyopathies dilatées. L'objectif de notre étude est d'analyser les fonctions cardiaques et musculaires de ce gène à travers l'étude d'un mutant du gène chez la souris. Nous avons appliqué à ce projet les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Nous avons réalisé des expériences préliminaires en cultures cellulaires qui confirment l'importance de ce gène pour la synthèse du NAD dans les cardiomyocytes. Pour le présent projet, le choix de l'expérimentation animale se justifie par le fait qu'il n'est pas possible de reproduire en culture la fonction cardiaque intégrée telle qu'elle se retrouve dans l'animal entier (organisation structurale, régulations neuro-hormonale, influence de la dépense énergétique globale de l'organisme). Les souris déficientes pour cette enzyme seront soumises à différents types d'exercices musculaires ou exposées à des doses d'activateurs adrénérgiques comme l'adrénaline puis analysées par des techniques d'échocardiographie (sous anesthésie gazeuse) et des tests d'efforts. Les fonctions contractile spécifiques du muscle seront mesurées sur l'animal *in situ* en anesthésie profonde après section d'un tendon pour fixation à l'appareil de mesure de la force. Après sacrifice, des analyses moléculaires seront réalisées pour déterminer l'impact sur l'expression des gènes du métabolisme énergétique et la production de NAD. Le substrat de cette enzyme, une vitamine, sera également utilisé sur des souris normales ou malades du cœur pour évaluer son intérêt thérapeutique. Le principe de réduction est appliqué par le calcul de puissance statistique de nos tests basés sur des expériences de même type dans d'autres modèles de souris qui nous permettent de réduire à 7 ou 10 souris par groupe, le nombre de souris utilisées. De plus les mêmes souris seront utilisées pour les tests cardiaques et les tests musculaires. Ce projet nécessitera au total l'utilisation de 160 souris. Le principe de raffinement est garanti par l'utilisation de méthodes modernes d'anesthésie et de chirurgie et d'analyses non invasives des fonctions cardiaques. Le test le plus invasif sera l'analyse des fonctions contractile du muscle sur animal en anesthésie profonde mais l'animal sera sacrifié à l'issue de l'analyse avant son réveil et donc avant la sensation de douleur. En fin, la définition du point limite est clairement établie à partir d'un seuil d'insuffisance cardiaque observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et l'euthanasie (et non pas la mort de l'animal des suites de la pathologie).

211- Les dispositifs médicaux implantables sont soumis, comme les médicaments, à une réglementation stricte permettant de garantir leur intérêt thérapeutique et leur innocuité.

Différentes études de caractérisation, de performance et de sécurité sont ainsi exigées lors du développement d'un nouveau dispositif médical avant toute obtention du marquage CE et donc de la mise sur le marché du nouveau produit.

Déterminer le délai de péremption du biomatériau, c'est-à-dire, définir le temps de maintien des propriétés du produit, fait parti des obligations lors du développement d'un nouveau biomatériau.

Dans ce but, il est nécessaire de réaliser des études *in vivo* afin d'étudier le comportement du biomatériau dans des conditions physiologiques similaires à celles imposées par un organisme.

En effet, les études *in vivo* sont les seules études capables de reproduire au plus près les différentes interactions physiologiques entre le dispositif implanté et l'organisme.

Le rat est un modèle dont les données cliniques et biochimiques sont aujourd'hui bien connues, ce qui explique qu'il est très souvent mis en œuvre comme modèle d'étude pour étudier la résorption des biomatériaux implantables.

De plus, ses propriétés intrinsèques et ses comportements sont bien connus, ce qui permet de détecter facilement tout signe de douleur et/ou de mal-être.

Ce projet a été élaboré en accord avec les 3R :

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique.

Ainsi, 10 rats seront inclus dans cette étude et deux articles seront implantés par animal permettant d'obtenir n=5 par article, nombre minimal nécessaire à la réalisation d'une analyse comparative.

De plus, l'implantation de 2 articles par rat de la même taille a déjà été réalisée et n'a provoqué aucun signe de mal-être chez l'animal.

Concernant le raffinement, des procédures analgésiques, anesthésiques et des suivis cliniques ont été intégrés au protocole expérimental permettant de suivre et de prévenir tout signe de mal-être animal.

En conclusion, déterminer le délai de péremption d'un dispositif médical implantable est une étape incontournable pour garantir l'efficacité et l'innocuité du produit.

Afin de mimer au mieux les phénomènes physiologique, cette durée de péremption doit être validée dans des conditions in vivo en obtenant des résultats prouvant le maintien des propriétés du biomatériau.

La connaissance approfondie du modèle de rat fait de cette espèce une espèce de choix dans la réalisation d'étude préclinique et permet d'obtenir des données reflétant les interactions physiologiques de l'organisme vis-à-vis du biomatériau.

Ce projet a été initié dans le respect de l'éthique, des besoins et de la sensibilité animale.

212- Ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le chien lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez le chien vigile après l'administration du candidat-médicament (6 animaux par étude; soit un nombre prévisionnel maximum de 60 animaux sur 5 ans).

Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 48 heures de récupération entre 2 administrations.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (chien, primate non-humain).

Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

213- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Alteplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aigüe de l'AVC ischémique thromboembolique.

Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, efficacité limitée chez 50 % des patients, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique.

De précédentes études nous ont permis de mettre au point un protocole de thromboembolie cérébrale dans lequel les thrombi générés semblent présenter une résistance à l'activité pharmacologique du rt-PA. Ce protocole pourrait donc mieux modéliser le cas problématique des patients ne répondant pas au rt-PA comparé aux modèles actuellement mis en œuvre.

L'objectif de ce projet est double : 1) caractériser notre modèle de thromboembolie cérébrale pour confirmer la résistance des thrombi au rt-PA et en aborder les mécanismes sous-jacents et 2) évaluer de nouveaux traitements thrombolytiques ou pro-thrombolytiques dans ce modèle pour le compte d'un client de l'industrie pharmaceutique.

Ce travail se situe dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'AVC thromboembolique. Les données générées seront précieuses et nécessaires pour décider de la réalisation ou non des essais cliniques. Le principal risque sur le plan éthique est que le développement des produits évalués n'aboutisse pas.

L'évaluation des propriétés thrombolytiques d'une molécule in silico ou in vitro ne permet pas de prédire l'efficacité du traitement dans le cadre d'une intervention visant à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC thromboembolique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisables par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le rat.

La caractérisation du modèle qui sera réalisée s'inscrit dans une approche de recherche translationnelle : la meilleure modélisation de la pathologie escomptée est un raffinement qui améliorera la prédictivité des tests réalisés comparée à celle des tests actuellement mis en œuvre.

Au total, 600 rats mâles Wistar seront utilisés pour ce projet. Sur la base de notre expérience du modèle, le nombre de rat utilisé pour chaque étude sera réduit au minimum garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats.

214- Le projet de recherche de notre équipe vise à acquérir des connaissances pour contrôler la fertilité des poissons d'élevage, que ce soit pour la réduire ou l'améliorer. Nous étudions les mécanismes de régulation permettant aux spermatogonies (cellules souches germinales) de se renouveler ou de produire des spermatozoïdes chez le poisson zèbre. Des lignées transgéniques de poisson zèbre ont été générées afin de marquer ces cellules souches par la synthèse, en leur sein, d'une protéine fluorescente. Les cellules fluorescentes observées chez ces animaux transgéniques pourraient être effectivement des cellules souches spermatogoniales mais cela doit être confirmé par des explorations moléculaires et fonctionnelles nécessitant leur purification. Le protocole présenté ici a pour objectif de mettre en place un traitement des animaux par un inhibiteur des divisions cellulaires, le busulfan, qui permettra d'enrichir la gonade en cellules souches spermatogoniales et de diminuer ainsi le nombre d'animaux nécessaires à la purification de ces cellules. Le busulfan est utilisé par la communauté scientifique travaillant dans le domaine de la reproduction car il permet d'éliminer les cellules germinales en prolifération rapide (cellules mitotiques ou méiotiques). L'inhibition de ces proliférations conduit à l'arrêt provisoire des vagues spermatogénétiques et à une stérilité transitoire variable selon les individus.

Le protocole expérimental consiste à traiter des poissons zèbre adultes mâles par une injection unique intra péritonéale de busulfan (40 mg/kg). Les animaux seront sacrifiés entre 5 et 15 jours après l'injection de busulfan pour vérifier la persistance des cellules fluorescentes et permettre l'enrichissement de ces dernières avant de les purifier par FACS (tri cellulaire par cytométrie en flux assistée par la fluorescence).

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 280 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative in vitro car il n'existe pas de lignées de cellules souches mâles adultes de poissons zèbre. Cependant, notre objectif de recherche permettra à terme de cultiver les cellules souches germinales de poisson zèbre et de pérenniser ces cultures sans avoir à sacrifier de nouveaux animaux.

- Réduction : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle de la réponse au traitement du busulfan. Le faible nombre de cellules souches germinales présentes dans la gonade mâle et le faible rendement des techniques de purification nécessitent le sacrifice de nombreux animaux pour l'obtention d'une quantité suffisante de matériel biologique par FACS. L'utilisation du busulfan permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la purification des cellules souches spermatogoniales grâce à l'enrichissement attendu de ces cellules dans les gonades des animaux traités.

- Raffiner : Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter la douleur induite par l'injection du busulfan. D'autre part, il permettra de décider d'une euthanasie prématurée en cas de comportements anormaux des animaux traduisant un mal être.

215- L'implantation de biomatériaux à visées thérapeutiques chez l'homme et chez l'animal est réglementairement précédée d'une phase au cours de laquelle ces biomatériaux sont évalués en termes de sécurité pour la personne ou l'animal qui les recevra ainsi que pour leur efficacité. Lorsque ces biomatériaux sont une évolution de produits existants ils sont de surcroît comparés à ces derniers. En fonction de la nature et de la taille des biomatériaux, différentes espèces animales doivent être utilisées pour ces études comme modèle de l'Homme ou de leurs propres congénères.

Depuis 2008, notre établissement a participé à des études de ce type concernant des biomatériaux fixés sur l'os (vis corticales, plaques, ligaments artificiels), des biomatériaux visant à la reconstruction de fragments osseux manquants (différentes préparations de type apatite, support de cicatrisation) ou des biomatériaux destinés à accélérer la cicatrisation tissulaire (cutanée ou viscérale) ou à combattre les hémorragies.

Ces expérimentations sont réalisées conformément à la norme ISO 10993 et les résultats des essais réalisés dans notre établissement peuvent directement être utilisés pour les demandes d'autorisation d'essais cliniques chez l'Homme auprès des comités de protection des personnes et de l'agence nationale de sécurité du médicament ou de l'agence nationale du médicament vétérinaire pour les essais cliniques chez les animaux.

La présente demande d'autorisation concerne des travaux portant sur la cicatrisation ou le remplacement de ligaments chez le lapin ainsi que sur l'utilisation de rats pour des essais portant sur des biomatériaux osseux implantables qui n'étaient pas couverts dans la saisine portant sur les essais de biomatériaux implantables envoyée en mars.

Chaque procédure nécessite de comparer deux groupes d'animaux compris entre 8 et 20 individus. Nous envisageons de répéter cette procédure jusqu'à 5 fois chaque année et de ce fait le nombre total d'animaux sur les cinq années de l'autorisation de projet sera de 500 rats et de 500 lapins. Ce nombre pourra être réduit si plusieurs biomatériaux sont comparés au même groupe contrôle ce qui n'est pas toujours possible pour des raisons de calendrier mais aussi car leurs formes doivent être similaires.

#### 216- Contexte scientifique

Le choc septique est la première cause de mortalité dans les unités de réanimation en France et dans le monde. Les travaux de recherche actuels utilisent tous comme modèles expérimentaux de sepsis des animaux ayant un cœur sain. Or en pratique

clinique, nos patients sont poly pathologiques, âgés et ont fréquemment un antécédent d'infarctus et/ou une fonction cardiaque altérée et/ou des troubles cardio-vasculaires.

Hypothèse de travail

La survenue d'évènements cardiovasculaires répétés pourrait protéger l'organisme et le rendre plus résistant au sepsis.

Objectifs principaux

Les objectifs sont d'étudier les modifications de pression du cœur et des vaisseaux, ainsi que les modifications métaboliques provoquées par l'induction du choc septique chez les rats avec ou sans pathologie associée.

Schéma de l'étude

Ce projet sera réalisé sur un nombre calculé de 109 rats Wistar, suivis pendant 9 semaines dans 2 établissements utilisateurs différents, faisant l'objet de 2 demandes d'autorisation distinctes (Partie 1 et Partie 2). Il repose sur l'induction d'un choc septique sur des rats jeunes et sains (Groupe 1), sur un modèle de rat mimant la rigidité artérielle due à l'âge (Groupe 2), sur un modèle de rat avec infarctus du myocarde (Groupe 3) et enfin sur un modèle de rat associant les 2 pathologies (Groupe 4).

Résultats attendus

Ce projet permettra d'évaluer la réponse du cœur et des vaisseaux lors d'un sepsis ainsi que l'influence de 2 pathologies habituellement présentes préalablement sur le fonctionnement du ventricule gauche et sur les modifications de métabolisme. Les conséquences péjoratives, ou au contraire protectrices, des évènements cardiovasculaires induits préalablement au sepsis, permettront de mieux cerner les mécanismes en cause dans cette pathologie à fort taux de mortalité et ainsi d'orienter vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

Principe de remplacement: le développement d'un choc septique provoque une défaillance multi organes qu'il n'est pas possible de mimer par une étude in vitro. L'étude nécessite donc l'animal entier.

Principe de réduction: l'estimation du nombre de rat tient compte du taux de mortalité lié aux procédures expérimentales. La bonne maîtrise des gestes expérimentaux et chirurgicaux par notre équipe permet de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Principe de raffinement: A leur arrivée, les rats sont mis au repos pendant une semaine avant la réalisation de la procédure expérimentale " VDN ». A la semaine 4, ils changent de lieu d'hébergement. Le transport (sur 500 m) sera assuré dans un véhicule climatisé à 20°C et les animaux seront hébergés dans des cages à couvercles filtrants, afin de minimiser le stress dû aux variations climatiques. La procédure expérimentale " IDM » est réalisée après une période d'acclimatation d'une semaine. La procédure expérimentale "sepsis" est réalisée à la 9ème semaine. Les animaux sont « mis à mort » 18h après par surdose d'anesthésique. L'anesthésie des animaux et les traitements analgésiques sont mis en œuvre pour chaque procédure expérimentale afin de réduire au maximum la douleur, la souffrance ou l'angoisse que pourraient ressentir les animaux.

## 217- Contexte scientifique

Le choc septique est la première cause de mortalité dans les unités de réanimation en France et dans le monde. Les travaux de recherche actuels utilisent tous comme modèles expérimentaux de sepsis des animaux ayant un cœur sain. Or en pratique clinique, nos patients sont poly pathologiques, âgés et ont fréquemment un antécédent d'infarctus et/ou une fonction cardiaque altérée et/ou des troubles cardio-vasculaires.

Hypothèse de travail

La survenue d'évènements cardiovasculaires répétés pourrait protéger l'organisme et le rendre plus résistant au sepsis.

Objectifs principaux

Les objectifs sont d'étudier les modifications de pression du cœur et des vaisseaux, ainsi que les modifications métaboliques provoquées par l'induction du choc septique chez les rats avec ou sans pathologie associée.

Schéma de l'étude

Ce projet sera réalisé sur un nombre calculé de 109 rats Wistar, suivis pendant 9 semaines dans 2 établissements utilisateurs différents, faisant l'objet de 2 demandes d'autorisation distinctes (Partie 1 et Partie 2). Il repose sur l'induction d'un choc septique sur des rats jeunes et sains (Groupe 1), sur un modèle de rat mimant la rigidité artérielle due à l'âge (Groupe 2), sur un modèle de rat avec infarctus du myocarde (Groupe 3) et enfin sur un modèle de rat associant les 2 pathologies (Groupe 4).

Résultats attendus

Ce projet permettra d'évaluer la réponse du cœur et des vaisseaux lors d'un sepsis ainsi que l'influence de 2 pathologies habituellement présentes préalablement sur le fonctionnement du ventricule gauche et sur les modifications de métabolisme. Les conséquences péjoratives, ou au contraire protectrices, des évènements cardiovasculaires induits préalablement au sepsis, permettront de mieux cerner les mécanismes en cause dans cette pathologie à fort taux de mortalité et ainsi d'orienter vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

Principe de remplacement: le développement d'un choc septique provoque une défaillance multi organes qu'il n'est pas possible de mimer par une étude in vitro.

L'étude nécessite donc l'animal entier.

Principe de réduction: l'estimation du nombre de rat tient compte du taux de mortalité lié aux procédures expérimentales. La bonne maîtrise des gestes expérimentaux et chirurgicaux par notre équipe permet de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Principe de raffinement: A leur arrivée, les rats sont mis au repos pendant une semaine avant la réalisation de la procédure expérimentale « VDN ». A la semaine 4, ils changent de lieu d'hébergement. Le transport (sur 500 m) sera assuré dans un véhicule climatisé à 20°C et les animaux seront hébergés dans des cages à couvercles filtrants, afin de minimiser le stress dû aux variations climatiques. La procédure expérimentale « IDM » est réalisée après une période d'acclimatation d'une semaine. La procédure expérimentale « sepsis » est réalisée à la 9<sup>ème</sup> semaine. Les animaux sont « mis à mort » 18H après par surdose d'anesthésique. L'anesthésie des animaux et les traitements analgésiques sont mis en œuvre pour chaque procédure expérimentale afin de réduire au maximum la douleur, la souffrance ou l'angoisse que pourraient ressentir les animaux.

218- Outre l'ingestion d'aliment, le lapin ingère des caecotrophes également appelés crottes molles qui peuvent représenter jusqu'à 15% de son ingéré sec journalier. Les caecotrophes fournissent à l'animal un apport en énergie, protéine, minéraux et sont essentiels à sa bonne santé puisque ce mécanisme lui permet de recycler des nutriments issus des fermentations et hydrolyses bactériennes qui ont lieu au niveau du caecum. Etant donné la part importante des caecotrophes dans l'alimentation du lapin, il convient d'étudier leur composition et de mener des études afin de connaître les leviers d'action permettant d'agir sur leur composition. Cette meilleure connaissance a pour but d'améliorer la composition de l'aliment destiné aux lapins d'élevage afin de répondre au mieux à leurs besoins.

Par ailleurs, l'étude des caecotrophes permettrait de connaître les leviers d'action permettant d'agir sur la flore caecale qui conditionne l'état sanitaire et l'efficacité digestive des lapins.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de l'alimentation sur la qualité et la quantité des caecotrophes afin d'améliorer la santé digestive et la nutrition des lapins d'élevage.

La contrainte majeure de ce projet est liée à la récolte des caecotrophes. La récolte des caecotrophes nécessite d'empêcher le lapin de pratiquer la caecotrophie (consommation d'une partie de ses crottes) durant un certain temps grâce à une collerette (similaire à celle utilisée pour les chiens suite à une opération). Ainsi, la collecte risque d'engendrer un léger stress mais ne cause aucune souffrance à l'animal.

Près de 490 lapins sont prévus pour ce projet, sur une période de 5 ans. Le modèle animal utilisé est le lapin de chair durant sa période d'élevage (entre 35 et 70j d'âge) car c'est l'espèce d'intérêt et qu'il pratique la caecotrophie, comportement pour lequel il n'existe pas de modèle in vitro. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, seuls des animaux homogènes et en bonne santé seront sélectionnés. Dans le but de réduire la gêne occasionnée, la période de collecte est réduite au maximum.

219- Ce projet trouve sa justification dans la qualification des nouveaux intervenants techniques (praticiens) et le perfectionnement du personnel déjà qualifié n'ayant pas participé à des procédures expérimentales réalisées sur le chien depuis plusieurs mois. Les objectifs principaux de ces entraînements et formations sont d'assurer la maîtrise des gestes techniques, essentielle au principe de raffinement et de réduction de nos procédures expérimentales, ainsi que d'assurer l'homogénéité inter-expérimentateur dans la réalisation des gestes techniques et le respect des modes opératoires normalisés, essentiels à la recevabilité scientifique et réglementaires des études menées. L'Art. R.214-105 du Code rural et de la pêche maritime autorise les procédures expérimentales ayant pour but la formation professionnelle continue.

Le projet est constitué d'une seule procédure expérimentale de formation et d'entraînement aux gestes techniques usuellement utilisés dans les études de toxicologie, toxicocinétique et pharmacocinétique, réalisées dans l'établissement utilisateurs, chez le chien. Il comporte la réalisation d'administrations, de prélèvement de sang, recueil d'urine, examens électrocardiographiques et ophtalmologiques. Toutes les administrations seront réalisées avec du sérum physiologique afin d'éviter tout effet pharmacologique ou toxique.

Six chiens seront utilisés dans ce projet. Il s'agit d'animaux disponibles dans l'établissement, ayant déjà été utilisés dans des procédures expérimentales de pharmacocinétique, et pour lesquels l'âge et la répétition des procédures ne permet plus de les inclure dans de nouvelles procédures de pharmacocinétique.

Le nombre de 5 animaux permettra au personnel de se former et de s'entraîner aux gestes techniques, tout en limitant leur nombre et leur fréquence pour chaque chien. La classe de gravité des procédures auxquelles ces animaux ont participé a été évaluée légère.

Tous les chiens ont été soumis à un examen vétérinaire qui a conclu qu'ils ont pleinement recouvré leur état de santé et de bien-être général. Un avis favorable à leur réutilisation dans une procédure de gravité légère ou modéré a été donné par un vétérinaire.

Afin de garantir le bien-être des chiens au cours des entraînements, les personnes en formation sont supervisées par un tuteur présentant les qualifications et l'expérience adéquates.

Enfin, dans le but de minimiser la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux engagés dans ces procédures, des points limites ont été définis en interne, conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique animal et les expérimentateurs. Une matrice d'évaluation a été élaborée et sera régulièrement revue et améliorée.

220- La mélatonine, hormone synthétisée par la glande pinéale, pourrait moduler certains déséquilibres dans les relations glucose/insuline. Des patients dont le gène des récepteurs de la mélatonine de type MT2 présente un variant non fonctionnel développent un diabète précoce. Les souris sans récepteur de la mélatonine de type MT2 présentent un état diabétique. Plus précisément, notre projet vise à valider l'effet correcteur de la mélatonine dans le diabète de type 2 à partir de modèles animaux pertinents (diabète d'origine génétique avec souris db/db et rat Zucker ; diabète nutritionnel avec souris et rats avec un régime hyperlipidique sans carbohydrate) et chez des animaux ayant des valeurs élevées de glycémie (quatre souches



différentes de souris). Des résultats positifs pourraient conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques en combinant des hypoglycémiantes à des composés mélatoninergiques.

Le présent projet vise à déterminer si un traitement à la mélatonine peut modifier le métabolisme du glucose. La régulation intégrée de la glycémie impliquant plusieurs organes à la fois (notamment, cerveau, foie, pancréas, surrénales, muscles), l'investigation de l'effet correcteur de la mélatonine sur la glycémie et le diabète de type 2 nécessite l'utilisation de modèles animaux *in vivo*.

Pour garantir des résultats valides sur le plan statistique (avec un seuil de significativité à  $P < 0.05$ ), 10 animaux par traitement seront systématiquement prévus pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle. Le nombre d'animaux proposé est basé sur une évaluation de la puissance statistique qui prend en compte les moyennes et la dispersion des données et le risque bêta (dans un essai thérapeutique, l'erreur statistique bêta fait courir le risque de ne pas mettre en évidence l'efficacité d'un traitement si le nombre d'observations dans les groupes témoins et traités sont trop petits ou trop dispersés). Selon les expériences, l'analyse statistique fera appel à une ANOVA à un facteur (traitement), à deux facteurs (temps x traitement), voire à trois facteurs (temps x traitement x souche) avec mesures répétées (pour la mesure de glycémie sur 24 hl. Une analyse du rythme sera également effectuée par la méthode du cosinor (régression non-linéaire avec sinuséide).

Ce projet impliquera un total de 360 rongeurs (procédure 1: 120 souris; procédure 2: 80 souris; procédure 3: 80 rats Sprague-Dawley; procédure 4: 80 rats Zucker).

221- L'objectif de l'étude est de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arythmie et le remodelage auriculaire afin d'identifier des cibles pharmacologiques potentielles pour traiter la fibrillation auriculaire associée à l'insuffisance cardiaque. Le modèle utilisé est celui d'un infarctus du myocarde chez le rat ou la souris pour induire un remodelage du ventricule gauche et des oreillettes droite et gauche.

Les rats ou souris seront traités pendant deux mois par des inhibiteurs de facteurs de la coagulation sanguine et de leurs récepteurs ou des inhibiteurs de canaux potassiques dans le but d'empêcher le remodelage auriculaire, puis soumis à des stimulations électriques trans-oesophagiennes pour induire l'arythmie. Nous étudions en particulier le facteur II de la coagulation (thrombine) et ses récepteurs, les canaux potassiques Kv1.5 et les protéines d'ancrage de la famille MAGUK. Nous utiliserons au maximum 500 rats et 300 souris en 5 ans.

Dans nos protocoles et analyses, nous prendrons les mesures suivantes pour appliquer la règle des trois R :

1- En ce qui concerne les études avec les anticoagulants, le suivi du traitement sera réalisé avec les plus petits volumes plasmatiques possibles pour effectuer des prélèvements jugulaires de 0.5 ml à différents temps sur le même rat. Cela permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires par 5 et de mesurer à la fois l'efficacité et la concentration plasmatique de l'anticoagulant.

2- Quelque soit le protocole, les molécules pharmacologiques données en traitement aux animaux sont sélectionnées au préalable par screening soit *in vitro* sur du plasma humain reconstitué ou des cultures cellulaires soit *ex vivo* sur des plaquettes sanguines de volontaires sains. Seul l'inhibiteur le plus puissant de la cible pharmacologique d'intérêt sera testé chez l'animal. L'étape de tests pharmacologiques *in vivo* chez le rat ou la souris est cependant indispensable avant l'utilisation chez l'homme.

3- Les modèles de dilatation auriculaire que nous réalisons sont associés à un statut hémostatique perturbé et à une insuffisance cardiaque due à une dysfonction ventriculaire. Bien que les traitements testés ciblent la fonction auriculaire, nous prélèverons du sang intracardiaque sur tous les animaux au moment du sacrifice pour préparer du plasma et le conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour des dosages ultérieurs. Concernant les tissus, nous prélèverons les oreillettes et les ventricules des animaux non traités contrôles et malades et des animaux traités pour extraire les ARN messagers (ARNm) et les protéines. Nous pourrions ainsi constituer une banque d'ARNm et d'extraits protéiques pour des analyses omiques postérieures qui permettront une caractérisation de nos modèles de dilatation auriculaire à l'échelle moléculaire. Cette banque pourra être utilisée par d'autres équipes pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'insuffisance cardiaque.

222- La schistosomiase est une maladie parasitaire touchant des centaines de millions de personnes dans le monde. Notre laboratoire produit des antigènes dérivés du parasite *Schistosoma mansoni* et utilise ces antigènes dans un but diagnostic. Notre laboratoire entretient également le cycle de ce parasite afin de fournir du matériel parasitaire aux équipes de recherche.

Des hamsters Syriens mâles seront utilisés dans ce projet. Brièvement, les hamsters seront infectés avec des larves (cercaires) de *S. mansoni* et après 45 jours, les hamsters seront sacrifiés afin de récupérer les vers adultes. Les protéines des vers adultes seront ensuite extraites et serviront de base aux tests diagnostiques. Chez le hamster infecté, nous récupérerons également le foie à partir duquel nous purifierons les oeufs du parasite. Ceux-ci seront utilisés pour assurer la pérennité du cycle, grâce à un élevage de mollusques que nous entretenons au laboratoire.

Ce projet répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Au total, 8000 hamsters (projet sur 5 ans) seront nécessaires pour atteindre nos objectifs. Cette utilisation maximise les données obtenues de chaque animal, ce qui peut limiter ou éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Si cela est nécessaire, des modifications des procédures seront prévues dans les procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse ainsi que d'améliorer le bien-être des animaux.

223- Ce projet se situe dans le cadre du programme Européen 7ème PCRD INMiND « Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases ». Il s'agit d'un programme collaboratif qui implique 27 partenaires Européens, financé pour 5 ans, et a démarré en mars 2012.

L'un des objectifs de ce programme est de développer de nouveaux traceurs utilisables en imagerie scintigraphique pour explorer la neuroinflammation dans différentes atteintes du système nerveux central, en particulier les maladies neurodégénératives

(Parkinson, Alzheimer). Différents traceurs radioactifs sont développés par les différents partenaires. Avant d'être proposés en clinique, ces traceurs doivent être validés chez l'animal.

Dans ce cadre, un protocole commun aux différents partenaires du Consortium a été rédigé, afin de pouvoir comparer les propriétés des différents traceurs chez l'animal, dans la perspective d'utiliser les plus adaptés d'entre eux chez l'Humain. Le modèle choisi est celui d'une inflammation cérébrale induite chez le rat Wistar.

Pour cette étude nous aurons besoin de 360 animaux pour l'ensemble du projet pendant ces 4 ans.

224- La maladie de Parkinson (MP) touche près de 150 000 personnes en France et environ 10.000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. C'est la deuxième cause de handicap moteur après les accidents vasculaires cérébraux. Elle est caractérisée par une dégénérescence lente et progressive des neurones dopaminergiques nigro-striés induisant une déficience en dopamine dans le striatum. Des processus neuroinflammatoires, communs à un grand nombre de maladies du système nerveux central (SNC) et dont le rôle délétère et/ou bénéfique est encore peu élucidé, sont également impliqués. Une meilleure compréhension de ce rôle dans la physiopathologie de la MP ouvrira la voie à de nouvelles approches thérapeutiques.

Dans ce cadre, l'utilisation de modèles animaux, même s'ils ne représentent que certains aspects de la maladie humaine, est un outil pertinent.

Ce projet propose d'étudier en parallèle l'évolution des neurones dopaminergiques et des processus neuroinflammatoires en utilisant une méthode d'exploration fonctionnelle in vivo, la TEP, dans un modèle animal de MP chez le rat traité ou non avec différents composés à visée neuroprotectrice.

Au total 4 groupes expérimentaux seront constitués par traitement. Tous les animaux seront explorés par imagerie in vivo, sous anesthésie gazeuse, puis seront mis à mort pour études autoradiographiques/biochimiques (sans perfusion) ou immunohistochimiques (avec perfusion)

- Groupe 6-OHDA + traitement, n= 12 (6 sans perfusion, 6 après perfusion)

- Groupe 6-OHDA + véhicule, n= 12 (6 sans perfusion, 6 après perfusion)

- Groupe Sham + traitement, n= 12 (6 sans perfusion, 6 après perfusion)

- Groupe Sham + véhicule, n= 12 (6 sans perfusion, 6 après perfusion)

Ces effectifs permettront de comparer les groupes en utilisant une ANOVA puis test de Mann et Whitney (petits échantillons). Ainsi 48 rats seront inclus au total par traitement.

Au cours des 5 ans, et en fonction des résultats, nous envisageons de tester au plus 8 modalités différentes de traitement (4/intracérébral + 4/systémique, en faisant varier les doses et le schéma d'administration), soient au plus 384 animaux pour 5 ans.

Eléments de remplacement, réduction et raffinement mis en œuvre :

- Le rat est l'espèce la plus adaptée pour cette étude, en raison du modèle de lésion à la 6-OHDA bien décrit dans cette espèce, et de la taille de son cerveau qui est compatible avec la résolution spatiale des caméras microTEP et permet de réaliser des études longitudinales d'imagerie in vivo.

- Après chirurgie stéréotaxique, le réveil de chaque animal est surveillé et une dose de Buprénorphine lui est donnée en post-opératoire. Une surveillance est effectuée quotidiennement. La douleur est évaluée chaque jour suivant les critères : apparition d'une agressivité, d'automutilation, d'une démarche altérée, d'un toilettage réduit ou d'une perte de poids, prostration, cachexie....

- L'enrichissement dans les cages d'hébergement est systématique (Sizzle Nest).

- L'utilisation de l'imagerie scintigraphique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car permet la réalisation d'études longitudinales et chaque animal est son propre témoin.

- A tout stade de l'étude, si les animaux présentent des critères de dépassement du point limite, ils seront euthanasiés par injection de pentobarbital dans la veine caudale.

225- Le Lipiodol est utilisé en chimioembolisation (ou cTACE pour conventional TransArterial ChemoEmbolisation) en association avec un anti-tumoral (AT) depuis de nombreuses années, avec bénéfice clinique. Sa nature huileuse est responsable de la formation d'une émulsion lorsqu'il est mélangé à un produit anti-tumoral (majoritairement un cytotoxique).

Les avantages associés à l'utilisation du lipiodol dans la chimioembolisation sont largement reconnus et ont conduit, depuis 25 ans, à de nombreuses études précliniques et cliniques. Le Lipiodol continue de nos jours à susciter un vif intérêt grâce à des propriétés physico-chimiques uniques qui lui confèrent des atouts majeurs face à arsenal concurrentiel émergent. Aujourd'hui la chimioembolisation est recommandée avec un niveau de preuve 1A par rapport aux BSC (best supportive care), et elle est classiquement utilisée comme gold standard dans les études comparatives des procédures concurrentes (chimioembolisation avec billes chargées ; embolisation seule...). Telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui, la chimioembolisation souffre d'être une technique liée à l'hétérogénéité des pratiques hospitalières qui en limite l'efficacité – la procédure d'émulsification étant opérateur- et centre-dépendant :

- type d'émulsion
- nature et dose de la drogue,
- nature de l'agent d'embolisation

- timing d'injection
- sélectivité
- nombre et rythme des cures, etc....

Aucune conclusion robuste ne peut être tirée sur des points très importants tels que le type et la taille des émulsions: les caractéristiques de l'émulsion idéale pour la chimioembolisation ne sont pas vraiment déterminées. Il paraît évident que de nouvelles études sont nécessaires, dans lesquelles le comportement in vivo de différents types d'émulsions correctement caractérisées sera rigoureusement étudié et permettra d'apporter des éléments scientifiques aux cliniciens dans leur pratique. Cette approche ne peut se faire que chez un organisme intégré (ex : animal) pour réaliser une intervention sous imagerie afin d'avoir tous les paramètres impliqués dans les procédures de radiologie interventionnelle.

Le modèle de lapin portant une tumeur VX2 orthotopique (hépatocarcinome, HCC) au niveau du foie est le modèle utilisé et recommandé dans les expérimentations de radiologie interventionnelle pour reproduire la chimioembolisation telle que pratiquée en clinique et sur lequel la majorité des thérapeutiques sont évalués.

L'expérience du centre expérimental ainsi que les compétences et expériences des intervenants dans ces différentes procédures et en expérimentations animales garantissent une prise en charge optimale du bien-être de l'animal selon des critères éthiques identifiés et mesurés afin de limiter la douleur, la souffrance et favoriser le bien être de l'animal.

Nombre total d'animaux 56

226- L'injection de produit de contraste est une opération de routine dans les services de radiologie permettant d'optimiser les techniques d'imagerie médicale. Cette opération est souvent automatisée à l'aide de système pousse-seringue permettant d'injecter ces produits à vitesse constante et suffisamment élevée pour obtenir des images exploitables (prise de ( ?) contraste en IRM, rehaussement en scanner X...). Les dispositifs médicaux disponibles nécessitent à l'heure actuelle un changement complet du dispositif d'injection (seringue tubulure, connectique...) induisant un surcoût non négligeable en terme de consommables. De plus il serait préférable d'avoir des dispositifs permettant des injections répétées chez un même patient sans avoir à interrompre ou prolonger l'immobilisation de ce dernier pour la mise en place d'un nouveau dispositif. Enfin certain pays autorise la délivrance multi doses pour différents patients à partir d'un même système d'injection. Dans tous ces cas la sécurité biologique, c'est-à-dire l'absence de risque de contamination est impérative.

Ce projet a pour but de valider l'étanchéité biologique, c'est-à-dire sa capacité à empêcher le passage de particules virales ou assimilées, d'un dispositif d'injection intraveineuse double valve en conditions expérimentales. Cette étude ce propose de valider un tel dispositif en mimant les conditions expérimentales d'injection chez un patient contaminant en s'assurant de l'étanchéité biologique du dispositif. Afin de mettre en œuvre cette étude deux primates non humains recevront par voie intraveineuse une faible dose d'albumine radiomarquée mimant la contamination sanguine virale (pas de risque pathogène pour l'animal). Les résultats obtenus contribueront à la certification de l'innocuité du dispositif d'injection multiple chez les patients. Les animaux anesthésiés seront mis en contact avec le dispositif d'injection dont nous souhaitons valider l'étanchéité. Les protocoles d'anesthésie et d'imagerie qui seront mise en œuvre sont similaires à ceux utilisés chez l'Homme. Les animaux sont anesthésiés lors des examens d'imagerie et l'anesthésie est suivie en continue afin d'éviter toutes effet négatif pour les animaux.

Les animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés en Europe. Leur nombre a été réduit au minimum (2 babouins) nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'efficacité de ce dispositif. La réalisation de plusieurs examens d'imagerie sur chaque animal permet de limiter le nombre total d'animaux. Le modèle primate se justifie par les similitudes anatomiques fortes permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation en pratique clinique chez l'Homme.

Les interventions sur les animaux sont classées au degré de sévérité léger. Les animaux seront réutilisés dans d'autres projets de recherche afin de limiter globalement le nombre d'animaux nécessaires en recherche bio-médicale. L'ensemble des recommandations du comité d'éthique seront mises en œuvre lors de la réalisation de ce projet.

227- Le projet consiste en le suivi par télémétrie (balises émettrices) de phoques sauvages dans leur milieu naturel, afin de mieux comprendre leurs stratégies d'utilisation de l'espace et des ressources marines et de répondre aux attentes des gestionnaires en charge de la gestion et la conservation de ces mammifères marins protégés et/ou de leur habitat naturel. Afin de réaliser ces suivis individuels, les phoques sont capturés dans leur milieu à l'aide de filets, pesés, tranquilisés chimiquement, leur poil est séché et dégraissé de façon à coller les balises sur le poil, quelques prélèvements biologiques sont effectués afin de compléter les informations obtenues par les balises grâce à des marqueurs génétiques et écologiques, puis les animaux sont immédiatement relâchés en mer. Ces opérations, durant environ 1 à 2 heure(s) entre la capture et le relâcher, sont intégralement réalisées sur le terrain (sur le littoral) et les animaux ne sont pas transportés en captivité. Les balises Argos ou GPS/GSM utilisées permettent de suivre leurs déplacements et activités en mer comme à terre pendant plusieurs mois (localisations, détails des plongées, périodes de repos à terre, etc.). Les balises tombent au plus tard 9 ou 10 mois après la pose, pendant la mue annuelle des phoques (lorsque le nouveau poil remplace l'ancien, la balise tombe avec l'ancien poil). Les deux espèces concernées sont le phoque gris (*Halichoerus grypus*) et le phoque veau marin (*Phoca vitulina*). Les phoques gris et phoques veaux marins étant des espèces protégées en France, une autorisation dérogatoire de capture doit être obtenue du ministère de l'Ecologie et du ministère de la pêche. Le nombre d'individus capturés et équipés de balise dépend de l'état des connaissances sur l'espèce concernée sur la colonie d'étude. La variabilité du comportement et des déplacements des phoques dépend en effet de l'espèce étudiée mais également de l'habitat fréquenté par ces phoques. Un nombre minimum d'individus doit être suivi de façon à tenir compte de cette variabilité dans l'étude des paramètres biologiques étudiés. Il reste néanmoins

toujours faible en raison de la difficulté technique de capture des individus. Le nombre total d'animaux capturés dans la durée du présent projet (5 ans) est de 90 individus maximum, avec un maximum de 15 individus par espèce, par colonie et par an.

228- La morphine liant les récepteurs opioïdes  $\mu$  (MOR) atténue les douleurs. Cependant, un traitement chronique permet le développement de la tolérance et la dépendance.

Cette tolérance pharmacologique se manifeste par l'accoutumance de l'organisme, produisant une diminution des effets de la morphine et entraînant la nécessité d'augmenter les doses de morphine pour avoir un même effet. Cette tolérance est complexe et fait intervenir des phénomènes adaptatifs: phosphorylation, blocage de voies intracellulaires. L'inactivation des MOR et leur implication dans la tolérance sont étudiées depuis de nombreuses années. Malgré ces efforts, cette approche n'a offert aucune perspective thérapeutique. Or, un point majeur de la tolérance n'a jamais été exploré et repose sur une constatation clinique: les patients tolérants répondent à la naloxone (antagoniste), créant une hyperalgie et indiquant que la fonctionnalité des MOR est intacte.

Ce projet évaluera l'implication du catabolisme cérébrale de la morphine dans la tolérance. La mise en évidence d'une adaptation du catabolisme cérébrale de la morphine lors d'une exposition chronique ouvrirait de perspectives thérapeutiques majeures.

Adéquation avec la règle des 3R

*Remplacer*

Nos modèles de culture de lignées tumorales (hépatocytes humains) se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire pour déterminer l'implication du catabolisme cérébral de la morphine dans les phénomènes de tolérance.

*Réduire*

Le nombre minimum d'animaux a été établi en fonction des approches nécessaires au projet qui ne sont pas compatibles (120 animaux au total)

*Raffiner (critères d'interruption)*

Le protocole d'induction de la tolérance à la morphine ne justifie pas l'utilisation d'antalgiques car les injections SC ne sont pas considérées comme douloureuses.

Des tests de sensibilité mécanique et thermique seront utilisés pour déterminer si les animaux ont développé une tolérance.

229- L'objectif de ce projet est de définir des leviers d'amélioration de la robustesse des poulets de chair standard afin de limiter les problèmes de lésions et de troubles locomoteurs, améliorer la résistance aux maladies et donc limiter la mortalité. Ces leviers d'amélioration devront permettre un maintien des performances, de l'efficacité alimentaire des poulets et de la qualité des produits. Les leviers envisagés sont les types de litière et l'alimentation.

3 modalités alimentaires variant par leur niveau de différents types de fibres, répondant aux besoins nutritionnels des poulets, et 2 matériaux de litière à base de paille seront évalués.

Avec nos connaissances actuelles, aucune alternative à l'expérimentation animale n'est possible pour évaluer les effets de nos traitements. Des poulets de chair Ross PM3 mâles seront placés au sol en groupe (48 parquets) à 16 animaux/m<sup>2</sup> (2208 animaux au total). Cette densité permet d'être proche des conditions terrain dans lesquelles les leviers devront être efficaces sans dépasser la densité réglementaire. Le nombre de répétitions par traitement a été calculé de façon à être statistiquement pertinent pour mettre en évidence une différence d'efficacité alimentaire entre les régimes (16 parquets/régime).

Les différentes mesures porteront sur:

- Les performances de croissance et mortalité
- Consommation d'aliment et d'eau
- Le comportement alimentaire et exploratoire des poulets
- Appréciation de la démarche des animaux
- Appréciation de la digestibilité
- L'humidité des fientes et l'état de la litière
- Morphologie (longueur et poids) des différents segments du tube digestif
- La conformation, les propriétés mécaniques et la qualité de la minéralisation osseuse
- L'apparition des lésions cutanées
- Rendements et pHu des filets

De plus, l'impact de nos traitements sur la résistance à différentes maladies inoculées (coccidioses et colibacillose) sera évalué.

L'utilisation d'animaux est nécessaire car aucune alternative n'existe à ce jour pour évaluer leur résistance aux parasites et bactéries pathogènes. Deux types différents de coccidies, problématiques dans la filière poulet, seront utilisés indépendamment avec suivi de la consommation alimentaire, du poids vif des poulets, dosage d'excrétion des parasites dans les fientes. Un total de 144 poulets (soit 24 poulets/traitements; nombre calculé pour mettre en évidence statistiquement des différences ayant un sens biologique entre traitements) sera prélevé et transféré en cages à 21 jours d'âge. Ces animaux seront ensuite euthanasiés 7 jours après inoculation et une notation des scores lésionnels sera effectuée sur le tractus digestif.

Pour E. coli, deux traitements seront comparés (le témoin et le traitement jugé le plus intéressant sur les critères de performances). 32 poulets (16/lot ; nombre calculé pour mettre en évidence statistiquement des différences ayant un sens biologique entre traitements) seront transférés en cages à 25 jours d'âge et inoculés à 26j. Ces animaux sont euthanasiés 2 jours

après inoculation. Une notation des scores lésionnels sera effectuée sur divers organes. Du sang et des organes (poumon, rate, foie) seront prélevés pour déterminer la charge bactérienne.

230- L'impact des effets du système immunitaire sur l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses a été démontré récemment *in vitro* et *in vivo*, par des études cliniques rétrospectives. Ainsi, l'induction de la mort cellulaire immunogène (Immunogenic Cell Death; ICD), en réponse à des agents chimiothérapeutiques comme les anthracyclines et l'oxiplatine, déclenche des réponses immunitaires anti-cancéreuses pouvant contrôler (ou éradiquer) les cellules tumorales ayant résisté aux thérapies. L'un des marqueurs précoces de l'ICD est l'apparition sur la surface des cellules tumorales mourantes, de calréticuline (CRT) représentant un nouveau signal « eat me » facilitant le transfert des antigènes tumoraux aux cellules présentatrices d'antigène du système immunitaire. Par ailleurs, il a été montré que la CRT exposée sur la surface cellulaire peut être opsonisée par des facteurs du complément et conduire à une perception tolérogène de la mort cellulaire. A partir de ces deux types de données, nous posons comme hypothèse que la présence de facteurs du complément comme le C1q ou le C3 ou de thrombospondine, servant de protéines de pontage entre les cellules mourantes et les phagocytes, jouerait un rôle clé dans le contrôle des réponses immunitaires contre les cellules tumorales subissant une ICD induite par la chimiothérapie. Dans ce projet, nous nous proposons de répondre aux questions clé suivantes: i : Est-ce que l'apparition de CRT, induite par l'ICD, facilite la liaison du complément et avec quel effet sur la réponse immunitaire ? ii. Comment un potentiel effet tolérogène apporté par le système du complément peut-il être abrogé, pendant les thérapies anti-cancéreuses, pour améliorer les résultats cliniques? Nous aborderons ces questions par des études de binding *in vitro* et *in vivo* par des études de vaccination anti-cancéreuse de souris immunocompétentes. Ces approches seront complétées par des études de RNA interférence et d'inhibiteurs pharmaceutiques pour valider les résultats et approfondir notre vue mécanistique des effets de l'ICD. Au total, les résultats de ce projet permettront une meilleure compréhension des interactions complexes mises en jeu à l'interface des cellules tumorales mourantes et du système immunitaire. La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer a été soigneusement appliquée de telle sorte que les approches *in vitro* principalement permettront d'établir une preuve du concept, minimisant le besoin d'études *in vivo*. Cependant, seule l'utilisation de différents modèles de souris pour l'étude des vaccinations anticancéreuses (manquant des composants essentiels du système de complément C1 ou C3) permettront d'obtenir les informations indispensables à l'aspect "recherche translationnelle" de cette étude, la reconstitution complète du système de complément ne pouvant actuellement pas être reconstruite *in vitro*. L'utilisation du nombre limite de 330 souris peut être justifiée par le fait que les données obtenues dans cette étude influenceront directement le développement clinique des prochains agents anticancéreux immunogéniques. Afin de minimiser la douleur, les animaux sont hébergés dans des cages sur un portoir ventilé équipé d'un abreuvement automatique. L'environnement des animaux est enrichi par des matériels de nidification en coton (nestlets), des rouleaux de carton (tunnel) et les pipettes de l'abreuvement sur lesquelles les animaux se perchent. Enfin, l'aspect général et le poids des animaux seront régulièrement (2 fois par semaine) contrôlés tout au long de l'étude pour garantir des conditions appropriées à l'espèce.

231- Le mélanome de l'uvée est la tumeur primaire intraoculaire la plus fréquente chez l'adulte. Dans 50% des cas les patients développent des métastases, situées au niveau du foie dans 90% des cas. Les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité contre les métastases.

Nous avons établi des modèles de tumeurs de mélanome de l'uvée directement à partir de biopsies de patients implantées sur des souris immunodéprimées (Xénogreffes).

Dans le mélanome de l'uvée toutes les mutations identifiées visent à inactiver une famille de protéines (protéine G). Sur la base de ces données, les traitements qui peuvent agir sur ces protéines G sont une voie prometteuse pour l'amélioration du traitement du mélanome de l'uvée.

Notre but est donc d'évaluer l'efficacité anti-tumorale de nouvelles molécules en bithérapie, toutes développées par le laboratoire NOVARTIS, sur nos modèles de xénogreffes de mélanome.

Expérimentations:

- Etude de toxicité: La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité des différentes molécules seules ou en association. Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est de 72 souris SCID.

- Etude d'efficacité: La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité des molécules sur les xénogreffes obtenues à partir des tumeurs humaines. Le nombre de souris pour les expériences d'efficacité est de 720 souris SCID.

Les expériences se déroulent selon les trois phases ci-dessous:

- Greffes et passages: Les xénogreffes de tumeurs de mélanome de l'uvée établies précédemment à partir de tumeurs de patients sont greffées sur des souris femelles adultes. Le nombre d'animaux greffés initialement est de 12 par groupe afin d'obtenir un nombre minimum de 10 souris (ayant une tumeur qui a poussé) par groupe. Un minimum nécessaire pour réaliser une étude statistique robuste sur l'effet des médicaments. La greffe de la tumeur se fait sous anesthésie générale. Une incision est faite au niveau de la région scapulaire et un fragment de tumeur est placé sous la peau. L'ouverture est ensuite refermée à l'aide d'agrafes. Les souris sont identifiées par des trous effectués aux oreilles à l'aide d'un poinçon.

- Croissance tumorale, traitements et mesures, prélèvements: Après la greffe, les souris ne développeront pas toutes une tumeur. Le taux de prise tumorale est de 50% à 100% en fonction du modèle greffé. Les tumeurs mettent entre 4 et 8 semaines (en fonction du modèle) pour se développer. La tumeur est mesurée avec un pied à coulisse. La souris est pesée une à deux fois par semaine. Des mesures régulières permettent l'évaluation de la croissance tumorale et l'évaluation de l'efficacité des molécules administrées. Le mode d'administration utilisé est Per Os (gavage avec une sonde).

- Prélèvements: A la fin de l'expérience des prélèvements de tumeurs seront réalisés après la mise à mort des animaux.  
- Critères de point-limites: Les points limites suivants, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour déterminer si les animaux sont en souffrance.

- perte de poids
- taille de la tumeur
- baisse de l'état général (prostration, plaie ...)

Les animaux sont alors sacrifiés par dislocation cervicale si l'un des point-limites est atteint.

232- Les formations doivent permettre aux candidats (personnel médical et paramédical: chirurgiens, infirmières, internes en chirurgie) d'acquérir la pratique des différentes techniques chirurgicales de base (acquisition d'une gestuelle sûre et précise, augmentation de la rapidité de réalisation des opérations en clinique) et une utilisation efficace du matériel de chirurgie et du robot-chirurgie.

Les enseignements pratiques sont tout d'abord dispensés:

- sur pièces artificielles (peau),
- sur pièces anatomiques (cœurs, pieds de cochons (animaux de boucherie)),
- sur 5 simulateurs de coelioscopie (2 simbionix) et des 3 pelvitainers
- sur 5 simulateurs de chirurgie robotique, et acquisition de 10 supplémentaires prévue pour 2013-2017), afin d'initier l'apprentissage des gestes de base.

En fin de parcours pédagogique seulement, les étudiants/stagiaires peuvent appliquer ces procédures sur l'animal.

Le modèle porcin est choisi pour ses similitudes anatomiques avec l'Homme.

Le modèle murin est choisi pour la réalisation d'anastomoses et de sutures dans des conditions comparables à celles de la microchirurgie.

Programme des enseignements pratiques sur cochons:

#### CHIRURGIE VASCULAIRE:

Abord du carrefour fémoral, abord de la carotide, abord de l'aorte rétro-péritonéale, utilisation d'une sonde de Fogarty, réalisation d'un pontage artériel périphérique, réalisation d'un pontage aorto-aortique, réparation d'une plaie veineuse, réparation d'une plaie artérielle.

#### CHIRURGIE THORACIQUE:

Sternotomie, thoracotomie, réparation d'une plaie cardiaque, d'une plaie pulmonaire, Lobectomie, pneumonectomie, résection pulmonaire atypique, suture bronchique.

#### CHIRURGIE DIGESTIVE:

Chirurgie ouverte: Les anastomoses digestives, les gastrectomies, les colectomies, les stomies intestinales, les résections rectales, les valves anti-reflux

Coelioscopie Création d'un pneumopéritoine, réalisation de nœuds intra et extracorporels, utilisation des nouvelles coagulations (ultracision - ligature), cholécystectomies, pose de valve anti-reflux.

Robot chirurgie Réalisation de nœuds intra-corporels, anastomose grêle-grêle, bypass, cholécystectomies, dissection du méso-rectum

#### CHIRURGIE UROLOGIQUE :

Chirurgie ouverte: Néphrectomie, urétérotomie / suture urétérale, pose de sonde urétérale JJ per-opératoire, suture vésicale, réimplantation urétéro-vésicale,

Coelioscopie: création d'un pneumopéritoine, mise en place des trocars, réalisation de nœuds intra- et extra-corporels, utilisation des coagulations (mono / bipolaire / ultracision / ligasure), utilisation des pinces automatiques, néphrectomie

Robot chirurgie: Néphrectomie, dissection du pédicule rénal, syndrome de la jonction pyélo-urétérale

#### CHIRURGIE GYNECOLOGIQUE:

Chirurgie ouverte: Chirurgie de l'utérus et des annexes

Coelioscopie: Création d'un pneumopéritoine, exploration de l'utérus et des annexes

Robot chirurgie: Ovariectomie, suture des trompes

#### CHIRURGIE PEDIATRIQUE:

Traumatisme abdominaux et viscéraux.

Programme des enseignements pratiques sur rats

Réalisation sous microscope d'anastomoses artérielles, veineuses et de sutures nerveuses.

233- Le succès de la thérapie basée sur des acides nucléiques synthétiques interférents (siRNA) repose presque exclusivement sur le développement de systèmes de livraison efficaces et sûrs. Le polyéthylèneimine (PEI) a acquis une position de leader en tant que transporteur de gènes en particulier en raison de sa plus grande efficacité in vivo par rapport aux lipides cationiques. Cependant, le PEI semble présenter une efficacité modeste pour délivrer des siARN. Afin d'améliorer considérablement la capacité de livraison de siRNA, nous avons préparé divers PEI capables d'auto-assemblage pour "mettre en cage" les siRNA dans des polyplexes, stables en dehors des cellules mais avec un potentiel de relargage des siRNA au niveau intracellulaire, lors de la détection de l'acidité endosomale. Nos résultats ont révélé que du PEI sur lequel du pyridyl est greffé (PEI1t) peut être un transporteur très efficace de siRNA in vitro et présente un fort potentiel in vivo. L'injection de polyplexes siRNA dans des tumeurs U87 humaines de glioblastome qui ont été greffées en sous-cutané dans un modèle de souris athymiques a entraîné

une extinction médiée par les siRNA qui s'est avérée significative (30% d'extinction 4 jours après l'injection). Cette recherche préliminaire, publiée dans le "Journal of Controlled Release", ouvre des perspectives intéressantes pour l'administration in vivo de siRNA surtout parce que notre polymère PEI1t n'a pas d'activité hémolytique et a un profil toxicologique in vitro meilleur que le PEI. Les doses pour l'administration in vivo n'ont pas été optimisées, laissant place à l'amélioration.

Nous proposons d'évaluer l'application thérapeutique de systèmes de livraison de siRNA basés sur le PEI1t (PNDS) en ciblant le foie, et plus précisément le carcinome hépatocellulaire. Nous allons utiliser un modèle sous-cutané et un modèle orthotopique d'hépatocarcinome pour évaluer la biocompatibilité (analysée en mesurant des paramètres hématodynamiques, les enzymes hépatiques et certaines interleukines et interférons), le ciblage hépatique des PNDS (analysé par marquage fluorescent des PNDS et leur efficacité thérapeutique (analysée par monitoring de la croissance tumorale par bioluminescence in vivo). L'efficacité de nos PNDS sera comparée au système de livraison le plus avancé pour le ciblage du foie (le SNALP), qui est développé par Tekmira / Alnylam et utilisé dans les essais cliniques.

234- L'objectif de cette étude est de caractériser l'implication de canaux ioniques Nav1.8 (SCN10A) et Nav1.9 (SCN11A) et TRPA1 dans les douleurs inflammatoires et les céphalées. Nous utiliserons les modèles d'inflammation aiguë (modèle de la carragénine), d'inflammation chronique (monoarthrite rhumatoïde) et de céphalée (injection de sumatriptan). Dans cette étude nous comparons les seuils d'allodynie mécanique et thermique, des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus l'un des canaux ioniques cités ci-dessus, avec des souris sauvages. Par la suite, nous sacrifions les souris pour mettre en culture les neurones sensorielles des ganglions dorso-rachidiens et des ganglions trijumeaux, dans le but d'effectuer des mesures électrophysiologiques. De plus, pour mesurer l'expression des canaux dans les différents modèles, des marquages immunohistochimiques seront réalisés sur des coupes de ganglions rachidiens et de trijumeaux.

235- La douleur est définie comme "une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à un dommage tissulaire présent ou potentiel, ou décrite en termes d'un tel dommage". Il existe différents types de douleur : douleur aiguë, symptôme d'une lésion, douleur chronique, qui est une maladie à part entière (on parle de douleur chronique après un délai d'évolution de 3 à 6 mois), douleur par excès de nociception, due à une stimulation excessive des récepteurs périphériques entraînant une douleur intense liée à des phénomènes mécaniques, inflammatoires, thermiques et chimiques, douleur neurogène, ne résultant pas de lésions tissulaires, dues à une interruption des voies nociceptives entraînant une perturbation du système de transmission, et douleur psychogène, n'ayant aucune cause somatique, due à un retentissement psychologique.

La morphine est un antalgique à effet central. Son effet est dû à son action d'activation dite agoniste des récepteurs opioïdes, en particulier mu, qui se situent au niveau de la moelle épinière et au niveau supra-médullaire. Mais la morphine a en plus de ses effets antalgiques des propriétés pharmacologiques à l'origine le plus souvent d'effets indésirables à type de constipation, nausées, vomissements et par son action sur les récepteurs mu, elle peut entraîner une dépression respiratoire (bronchoconstriction) et un effet sédatif.

L'opiorphine est une substance chimique pentapeptidique isolée dans la salive humaine en 2006 par des chercheurs français de l'Institut Pasteur de Paris. Les études que nous avons déjà réalisées chez le rat en collaboration avec l'Institut Pasteur et dont certaines ont été publiées ont montré qu'elle est autant voire plus efficace que la morphine pour lutter contre les douleurs aiguës physiques ou inflammatoires. Elle cause aussi beaucoup moins d'effets secondaires (principalement l'absence de phénomène d'addiction), ce qui laisse envisager à terme la création de nouveaux médicaments analgésiques. L'Opiorphine n'agit pas directement, comme les enképhalines ou la morphine, sur les récepteurs des opiacés pour bloquer la perception de la douleur. Elle prolonge et amplifie l'action des opiacés naturels, les enképhalines, en bloquant les enzymes chargés de les détruire. Dans la perspective d'application thérapeutique, l'équipe de l'Institut Pasteur travaille à présent à optimiser l'Opiorphine de synthèse qu'elle a produite pour la rendre plus stable, de manière à augmenter sa biodisponibilité et sa durée d'action.

L'objet de cette étude est donc d'étudier, dans les tests de douleur de retrait de la queue (Tail-Flick) et de formaline, l'efficacité d'un nouveau dérivé d'opiorphine (DerOp 2) administré par voie intraveineuse (IV). Le test du Tail-Flick permettra de déterminer la ou les doses efficaces et le temps d'administration optimale du produit avant le test de la formaline. Pour le test à la formaline, le nombre et la durée de léchages de la patte injectée avec la formaline ainsi que le nombre de soubresauts du corps de l'animal seront enregistrés pendant l'heure de test.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, l'étude portera sur 34 rats mâles Wistar adultes répartis en quatre groupes de 4 rats utilisés pour le test du Tail-Flick et trois groupes de 6 rats utilisés pour le test de la formaline, permettant d'obtenir des résultats significatifs selon notre expérience passée de ces tests (raffinement).

L'enjeu social est donc de pouvoir à terme, remplacer ou substituer partiellement la morphine par un dérivé de l'Opiorphine afin de diminuer les doses de substances à utiliser et surtout de limiter les effets secondaires, ce qui d'un point de vue économique, contribuerait à réduire considérablement les dépenses publiques compte-tenu du nombre de patients à qui l'on prescrit des molécules anti-douleurs. Réalisation sous microscope d'anastomoses artérielles, veineuses et de sutures nerveuses.

236- L'inflammation de la peau ou inflammation cutanée (aussi connue sous le nom de dermatite) est une pathologie très fréquente et dont l'incidence est en constante progression.

L'inflammation cutanée chez l'Homme se caractérise par la présence sur la peau des 4 points cardinaux de l'inflammation : la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur.

Les causes de l'inflammation cutanée sont nombreuses : les infections, localisées ou plus étendues, dues à un microbe (abcès, folliculite, furoncle...), un parasite (poux, gale, tique...), un virus (varicelle, rubéole, herpès, zona...) ou encore un champignon (mycose), pouvant toucher toutes les régions de la peau sans exception, les inflammations des articulations provoquant pratiquement toujours une inflammation de la peau en regard, les inflammations des vaisseaux, en particulier des veines et des vaisseaux lymphatiques, les allergies et les réactions inflammatoires à des agressions mécaniques ou chimiques ou encore aux rayonnements ou aux radiations (soleil, rayons X...).

Parmi les différentes formes d'inflammation cutanée, la dermatite atopique ou eczéma atopique et le psoriasis sont les 2 formes les plus importantes. La dermatite atopique se traduit par des plaques rouges en particulier sur les plis de la peau et les convexités du visage, associées à des démangeaisons (prurit) et des zones de peau sèche (xérose), entraînant souvent des troubles du sommeil. Si une prédisposition génétique est certaine, la hausse de la prévalence des dermatites atopiques observées au cours de 40 dernières années signale que des modifications de l'environnement jouent un rôle dans le phénomène. Le psoriasis est très fréquent puisqu'il concerne environ 2% de la population, les personnes d'origine européennes en souffrant plus fréquemment que les autres. Il se traduit par la formation de plaques rouges accompagnées de squames (peau morte) avec une localisation très variée, zones de frottement comme les genoux, les coudes, la région lombaire, les plis, mais aussi le cuir chevelu, les mains et les pieds, les ongles et les muqueuses. Si des facteurs génétiques sont également connus, des anomalies immunitaires et des facteurs déclenchants ou aggravants des crises de psoriasis sont nombreux : frottements des habits sur la peau, contrariété ou stress psychologique, surmenage, alcool, surcharge pondérale, infection (angine, rhinite, pharyngite) et même certains médicaments par effet secondaire.

La recherche étudie aujourd'hui les anomalies génétiques et les anomalies de voies de signalisation aboutissant à une sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires dans ces 2 formes de pathologies. Les progrès thérapeutiques récents reposent avant tout sur la mise en place de techniques permettant un meilleur ajustement des outils thérapeutiques aux besoins des patients. Car si ces pathologies ne mettent que rarement la vie en danger, il est fréquent qu'elles diminuent gravement la qualité de vie. Le but de ce projet est donc d'évaluer les effets de 4 extraits de plantes, EP1, EP2, EP3 et EP4 ayant des propriétés anti-inflammatoires démontrées par des études in vitro, sur un modèle d'inflammation cutanée chronique que nous avons développé et validé chez la souris Hairless Skh-1 et sur lequel nous avons publié très récemment.

Ce modèle d'inflammation cutanée chronique obtenu par applications cutanées répétées de 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) mime le psoriasis et la dermatite atopique observés chez l'Homme.

Les protocoles expérimentaux effectués sur 54 souris femelles Hairless Skh-1 impliquent :

- Applications cutanées de TPA pour l'induction et le maintien de l'inflammation cutanée
- Applications cutanées des 4 extraits de plantes EP1, EP2, EP3 et EP4
- Observation des effets cutanés des traitements
- "Mise à mort" des animaux

Les études précédemment réalisées sur ce modèle d'inflammation cutanée, ne pouvant être effectuées sur des modèles in vitro (Remplacement), ont permis de démontrer que le nombre d'animaux par groupe prévu pour cette étude, 6 souris, permettait d'obtenir des résultats significatifs (Réduction et Raffinement).

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence de l'inflammation cutanée dans la population européenne notamment, cette étude présente un enjeu socioéconomique certain car les extraits de plantes pourraient ensuite être testés chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à des traitements moins coûteux et surtout avec peu ou pas d'effets secondaires associés.

237- Ce projet a pour objectif de déterminer les effets bénéfiques d'une expression compensatoire de l' $\alpha$ -actine cardiaque dans le cœur de souris adulte de 2 mois qui développe une cardiomyopathie dilatée (absence d'expression du gène SRF spécifiquement dans le cœur), cette pathologie entraîne une insuffisance cardiaque pouvant conduire à la mort. Dans ce modèle induisant le développement d'une cardiomyopathie dilatée, nous avons montré que l' $\alpha$ -actine cardiaque était la première cible touchée par l'invalidation de SRF et ainsi jouait un rôle crucial dans ce processus. Dans ce nouveau modèle, le rôle déterminant de l' $\alpha$ -actine cardiaque par expression compensatoire combiné à l'invalidation du gène SRF sera analysé avec à la clé l'identification de nouveaux facteurs et/ou molécules impliqués dans ce processus délétère.

Un total de 100 souris adultes mâles et femelles ayant 4 phénotypes différents sera utilisé (contrôles; compensation par l' $\alpha$ -actine cardiaque; mutant SRF et mutant SRF avec compensation de l' $\alpha$ -actine cardiaque). Dès le début de l'expérimentation, un suivi régulier des animaux aura pour but de les observer et de limiter la douleur pour chacun d'entre eux. Malheureusement, pour répondre aux objectifs fixés, l'absence de modèles in vitro adéquates de cultures cellulaires nous oblige à créer puis à développer des modèles de souris transgéniques.

238- Cette dernière décennie, la définition des cellules souches a beaucoup évolué et nous disposons de nombreux exemples de cellules différenciées capables de devenir des cellules progénitrices pour d'autres types cellulaires ou même dans d'autres tissus. La régénération de la nageoire de poisson zèbre adulte offre un modèle pertinent de régénération intégrée et permet de poser deux questions importantes dans le cadre de la médecine régénérative : Quelles sont, au niveau d'un organe, les cellules capables d'être mobilisées pour la reformation d'un tissu ou d'un organe? Quel est l'environnement cellulaire/les signaux impliqués dans leur mobilisation ? La nature de signaux émis après amputation régulant le recrutement de ces cellules progénitrices n'est que peu élucidée. Dans le futur, nous souhaitons poursuivre nos travaux sur ces premières heures post-amputation qui sont cruciales



239- La maîtrise des cycles sexuels en élevages ovins est indispensable pour pratiquer l'insémination artificielle, mettre en place le schéma de sélection et diminuer les périodes improductives en permettant un étalement de la production de lait et des produits dérivés ainsi que de viande sur toute l'année. Cette dernière condition est particulièrement importante chez les ovins, dont la reproduction est caractérisée par une période de repos sexuel en période de jours longs et une seule mise bas par an en février mars. Pour pallier à ce problème, des traitements hormonaux sont utilisés pour la maîtrise de la reproduction. Ils miment un cycle sexuel et permettent l'induction et la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation en période de repos sexuel. Chez les ovins, le traitement couramment utilisé sur le terrain associe une éponge vaginale de progestagène et une injection d'eCG (hormone extraite du sang de jument gestante).

Cela permet de synchroniser le cycle et d'induire une ovulation en période d'an œstrus saisonnier. L'ovulation peut être induite également en faisant une injection de LH 36 heures après retrait de l'éponge ou deux injections de FSH à 24 heures et 12 heures avant le retrait de l'éponge. La LH et la FSH sont des hormones extraites d'hypophyses de porc ou de mouton. Bien que ces pratiques zootechniques soient largement utilisées dans les pays pratiquant un système d'élevage intensif, un certain nombre de problèmes restent récurrents et conduisent à de mauvais résultats de fertilité chez les femelles traitées et inséminées. L'eCG, la FSH et la LH sont immunogènes et induisent une réponse immunitaire chez les femelles traitées, qui va inhiber l'efficacité des traitements suivants. L'utilisation de ces hormones, extraites de tissus animaux, présente également un risque sanitaire potentiel pour les animaux d'élevages et, par conséquent, pour la qualité des produits dédiés à la consommation (lait, viande, produits laitiers).

C'est dans ce contexte et pour pallier à ces effets secondaires néfastes que nous développons une méthode alternative aux traitements hormonaux d'induction de l'ovulation ne présentant pas les défauts décrits ci-dessus.

Les molécules que nous avons développées ont été sélectionnées grâce à des essais *in vitro* réalisés sur des lignées cellulaires spécifiques. Cependant, la fonction de reproduction chez les mammifères est le fruit d'une communication hormonale étroite et complexe entre l'hypothalamus, l'hypophyse, et les gonades. Chacun de ces organes sécrète des hormones qui agissent, selon le moment du cycle sexuel, soit de manière négative, soit de manière positive, sur l'organe cible. Des modèles *in vitro* permettent d'étudier les effets de chacune de ces hormones individuellement, mais aucun ne permet d'analyser les effets des rétrocontrôles entre hypothalamus, hypophyse et gonades. Il n'est donc pas possible d'analyser les effets des molécules agissant sur la fonction de reproduction uniquement avec des modèles *in vitro*, ceux-ci ne pouvant refléter une telle complexité.

Nos molécules ont été testées chez le rat afin de confirmer leur effet *in vivo*. Il est maintenant nécessaire de les injecter à l'espèce cible. Ces traitements alternatifs seront destinés à être utilisés chez les animaux de rente, dont les ovins. Nous souhaitons injecter ces molécules à des brebis pour :

1) mesurer leurs effets *in vivo*

2) déterminer la quantité à injecter et le moment optimal pour la ou les injections de molécules afin d'obtenir un effet maximal. Pour réaliser cette étude, nous effectuerons deux procédures expérimentales qui nécessiteront chacune 32 brebis. Soixante-quatre brebis seront donc nécessaires pour ce projet. L'effectif nécessaire a été estimé grâce à des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'INRA, pour atteindre une puissance de test statistique d'au moins 80% avec un seuil de risque  $\alpha$  de 0.1. Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, l'expérience sera répétée plusieurs fois sur les mêmes animaux, avec un intervalle d'au moins 1 mois entre chaque expérience.

240- Nous savons que les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (dysfonctionnement chronique des reins) meurent plus souvent lors d'une infection qu'un patient qui n'aurait pas d'insuffisance rénale chronique. Ce projet a pour but de mieux comprendre les raisons de cette surmortalité en cas d'insuffisance rénale chronique et d'infection (choc septique). Pour mieux comprendre il est nécessaire d'analyser la composition de différents organes au cours de l'infection et de l'insuffisance rénale chronique. Cette analyse nécessite de prélever des organes (cœur, rein, rate) au cours de l'infection ce qui ne peut pas être réalisé chez le patient. Nous allons par conséquent créer chez la souris un état similaire en créant une insuffisance rénale chronique puis un choc septique. Pour ce faire 150 souris seront opérées sous anesthésie générale. Pour 75 d'entre elles nous créerons une insuffisance rénale chronique alors que les 75 autres auront une opération « blanche » (c'est à dire sans création d'insuffisance rénale). Ensuite pour la moitié de chacun des ces groupes (insuffisance rénale chronique ou opération blanche) une infection sera créée par chirurgie sous anesthésie générale ou par injection d'une protéine. L'autre moitié des animaux n'aura pas d'infection. Ces animaux nous permettront d'effectuer des analyses des organes pour identifier les raisons de cette surmortalité chez l'homme insuffisant rénal chronique. Il n'est pas possible de réaliser ce type d'analyse d'organes en dehors de l'animal (par exemple sur des cellules *in vitro* ou des modèles mathématiques ou bioinformatiques) car l'infection provoquée s'accompagne d'une inflammation de l'ensemble de l'organisme où chaque organe participe à l'état inflammatoire de l'organisme. Nous aurons besoin d'étudier 150 animaux pour obtenir une puissance statistique suffisante, minimiser au maximum les variations naturelles qui peuvent exister d'un animal à l'autre, pouvoir déterminer au préalable la dose optimale de protéine nécessaire pour provoquer une infection significative chez la souris et nous permettre d'analyser un maximum d'organes sur chaque animal. Chaque étape de cette étude sera réalisée en prenant soin de surveiller la qualité des soins avant, pendant ou après chaque chirurgie en prenant garde de respecter l'hygiène, l'alimentation et le bien être de l'animal. Plus particulièrement la douleur et la souffrance de chaque animal seront évaluées puis soulagées si nécessaire par administration de médicament.

241- L'objectif du projet est de caractériser les relations entre des variations de la flore microbienne intestinale et des changements métaboliques de l'organisme hôte dans des systèmes modèles du syndrome cardiométabolique (SCM). Cette

recherche se fonde sur des observations récentes du laboratoire et utilise les concepts émergents de métagénomique et d'effets transgénomiques qui jouent un rôle important dans les adaptations fonctionnelles des génomes des Mammifères aux changements de leur environnement et qui peuvent contribuer à une prédisposition accrue à certaines maladies génétiques. Le microbiote intestinal est un système complexe symbiotique entre le mammifère hôte et les milliards de bactéries intestinales qui communiquent avec le métabolisme des mammifères. Ce microbiote transforme les nutriments et permet leur entrée en contact avec l'organisme. La contribution respective du génome de l'hôte dans l'élaboration de la microflore intestinale et du microbiote intestinal dans la régulation de l'expression du génome de l'hôte est un domaine de plus en plus actif de recherche. Les modèles de rats sont des outils essentiels, partageant avec l'Homme de fortes homologues de régulations physiologiques et de composition bactérienne de flore intestinale. Le rat est le modèle animal préféré pour les études de physiologie et de pharmacologie de part les volumes d'échantillons, notamment sanguins, accessibles comparativement à la souris. Nous utiliserons deux modèles de rat isogéniques développant spontanément des phénotypes centraux dans le SCM: Le rat GK (Goto-Kakizaki), qui présente une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline et le rat SHR (Spontaneous Hypertensive Rat), qui, généré initialement pour étudier les gènes associés à l'hypertension, développe également une insulino-résistance et une dyslipidémie. Deux souches isogéniques contrôles seront utilisées : le rat WKY (Wistar Kyoto) et le rat BN (Brown Norway).

1. Nous effectuerons une étude approfondie séquençage complet des bactéries du cæcum de rat GK, SHR, WKY et BN, n=3 rat par groupe. 2. Nous déterminerons le rôle du microbiote intestinal dans le développement du SCM chez le rat par une approche in vivo par transfert. Pour déterminer le rôle causatif du microbiote intestinal dans le développement du SCM chez le rat, nous effectuerons des expériences de transfert de flore. Nous inoculerons par gavage orale du contenu caecal (300microlitres) de rats témoins (3 rats BN ou 3 rats WKY) dans des rats SCM (6 rats GK ou 6 rats SHR) et réciproquement de rats SCM (3 rats GK ou 3 rats SCM) dans des rats témoins (6 rats BN ou 6 rats WKY). 60 rats au total. Les explorations physiologiques seront entreprises 2 semaines avant gavage et 2 semaines, 1 mois et 2 mois après gavage. Les phénotypes mesurés seront le poids corporel, la glycémie, la tolérance au glucose, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et la pression artérielle.

242- Nous déterminerons le rôle de métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la sécrétion d'insuline. Des métabolites dérivés de la flore intestinales ont été identifiés par analyse in silico de données de métabolomiques comme cibles impliquées dans l'altération de la sécrétion d'insuline en réponse au régime riche en graisse chez la souris C57BL6J. Nous testerons l'impact d'une supplémentation de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris. Nous avons débuté cette étude par une étude in vitro de l'effet de ces métabolites sur le métabolisme glucidique de cellules pancréatiques et adipocytaires en culture. Nous mettons en évidence un effet délétère d'une supplémentation en métabolites de type tri-méthylamine sur la fonction des cellules beta pancréatiques in vitro. Ces métabolites dont l'effet in vitro est validé seront testés in vivo sur la souris. Nous testerons l'effet d'une supplémentation in vivo par une injection intrapéritonéale de métabolites sur des groupes de 8 souris C57BL6J. Si l'effet observé in vitro a nécessité un temps long d'incubation, nous envisagerons jusqu'à une injection quotidienne sur 4 jours. Nous limiterons le nombre de groupe contrôle par la réalisation des expériences en parallèle pour qu'un groupe contrôle soit utilisable pour plusieurs groupes expérimentaux. Nous utiliserons ainsi au maximum 160 souris (10 métabolites au plus, 8 souris par groupe et 8 groupes contrôles au plus), sur 2 ans. Concernant la règle des 3R, le remplacement a été effectué en débutant cette analyse in vitro. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissu producteur et cible de l'insuline. Au delà des tests in vitro, une étude in vivo est indispensable. La réduction est prise en compte, n=8 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour pouvoir avoir le moins de groupe contrôle possible. Et le raffinement, nous limiterons au maximum le nombre d'injection, le volume injecté, nous laisserons au maximum les souris dans leur cage, enrichie avec un tunnel. Les souris seront 4 par cages. Et au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux.

243- Les études épidémiologiques montrent que la dyslipidémie et l'obésité apparues à l'âge moyen sont des facteurs de risque importants des maladies neurodégénératives, particulièrement de la maladie d'Alzheimer (MA). Le maintien de l'homéostasie lipidique apparaît donc crucial pour un bon fonctionnement au cours du vieillissement cérébral, notamment afin d'éviter ou au moins de retarder l'apparition de ces maladies.

Nous avons un modèle souris qui démontre une dyslipidémie associée à une surcharge pondérale, ainsi qu'à une diminution de la capacité cognitive au cours du vieillissement. Ce modèle de dyslipidémie est mis au point sur la souris C57BL/6J, une lignée qui est largement employée pour les études portant sur le métabolisme lipidique, l'obésité et la neurobiologie.

Pour ce projet, nous utilisons une technique d'injection stéréotaxique intracérébroventriculaire (ICV) des oligomères solubles du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ O<sub>s</sub>), un agent neurotoxique centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la MA, afin de déterminer la sensibilité de ces souris avec les troubles lipidiques aux effets neurotoxiques d'A $\beta$ O<sub>s</sub>. Cette étude nécessite 80 souris réparties en 8 groupes de 10 animaux. Ce nombre est suffisant et nécessaire pour obtenir de bonnes interprétations statistiques correctes des résultats. Nous surveillons tout au long de l'étude l'état général de l'animal, la présence d'une perte de poids excessive (+ de 10 % du poids initial), l'arrêt de la prise alimentaire solide et l'apparition de tremblements, prostration, diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs, diarrhées prolongées, hypothermie prolongée; pilo-érection ; respiration anormale; absence de toilettage. Pendant la période post-opératoire (ICV en stéréotaxie), l'apparition de signes de souffrance physique, d'hypothermie ou d'anomalies comportementales est particulièrement surveillée lors de la phase

de réveil et toute la journée. Lors des 3 jours suivants (de J1 à J3), c'est-à-dire jusqu'au début des analyses comportementales, les souris sont surveillées 2 fois par jour.

244- Les études épidémiologiques montrent que la dyslipidémie et l'obésité apparues à l'âge moyen sont des facteurs de risque importants des maladies neurodégénératives, particulièrement de la maladie d'Alzheimer (MA). Le maintien de l'homéostasie lipidique apparaît donc crucial pour un bon fonctionnement au cours du vieillissement cérébral, notamment afin d'éviter ou au moins de retarder l'apparition de ces maladies.

Nous avons un modèle souris qui démontre une dyslipidémie associée à une surcharge pondérale, ainsi qu'à une diminution de la capacité cognitive au cours du vieillissement. Ce modèle de dyslipidémie est mis au point sur la souris C57BL/6J, une lignée qui est largement employée pour les études portant sur le métabolisme lipidique, l'obésité et la neurobiologie.

Pour ce projet, nous utilisons une technique d'injection stéréotaxique intracérébroventriculaire (ICV) des oligomères solubles du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ 0s), un agent neurotoxique centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la MA, afin de déterminer la sensibilité de ces souris avec les troubles lipidiques aux effets neurotoxiques d'A $\beta$ 0s. Cette étude nécessite 80 souris réparties en 8 groupes de 10 animaux. Ce nombre est suffisant et nécessaire pour obtenir de bonnes interprétations statistiques correctes des résultats. Nous surveillons tout au long de l'étude l'état général de l'animal, la présence d'une perte de poids excessive (+ de 10 % du poids initial), l'arrêt de la prise alimentaire solide et l'apparition de tremblements, prostration, diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs, diarrhées prolongées, hypothermie prolongée; piloérection ; respiration anormale; absence de toilettage. Pendant la période post-opératoire (ICV en stéréotaxie), l'apparition de signes de souffrance physique, d'hypothermie ou d'anomalies comportementales est particulièrement surveillée lors de la phase de réveil et toute la journée. Lors des 3 jours suivants (de J1 à J3), c'est-à-dire jusqu'au début des analyses comportementales, les souris sont surveillées 2 fois par jour.

245- Le présent projet a pour cadre le développement d'un nouveau médicament. Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales de pharmacocinétique en dose unique et en doses répétées, de distribution tissulaire et de métabolisme menées chez la souris. Il est conçu pour être répété en totalité ou partiellement pour chaque produit testé. Il permet d'obtenir les informations relatives à l'absorption, à la distribution, au métabolisme et à l'élimination du principe actif étudié, nécessaires pour sélectionner les doses et schémas d'administration pour les études de pharmacologies réalisées chez la souris, pour confirmer, le cas échéant, la pertinence de l'espèce souris pour les études de toxicologie, pour contribuer à la sélection des doses, fréquence et voie d'administration pour les études de toxicologie lorsque l'espèce retenue est la souris, pour contribuer à la sélection de la première dose à administrer lors des essais cliniques chez l'Homme et constituer les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments auprès des autorités de santé. Les résultats obtenus pourront aussi être utilisés en support aux études de pharmacologie.

Lorsque cela est possible, plusieurs procédures expérimentales peuvent être combinées de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés.

Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standards), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux exigences réglementaires et/ou aux pratiques reconnues par la communauté scientifique. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une ou plusieurs procédures expérimentales dans le cadre de l'évaluation d'un candidat médicament. Il précise les éléments spécifiques comme le calendrier, les conditions de traitement (voie, dose, fréquence) et d'examen, les gestes techniques. Les effectifs prévus sont les effectifs usuellement utilisés pour ce type d'étude et permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente. L'effectif maximum total estimé est de 5617 animaux utilisés dans ce projet sur 5 ans.

Dans le but de minimiser la souffrance, la détresse et l'inconfort des animaux engagés dans ces procédures, des points limites permettant de statuer rapidement sur la conduite à tenir vis-à-vis de l'animal ont été définis en interne. Une matrice d'évaluation a été élaborée conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique animal et les expérimentateurs et sera régulièrement revue.

Enfin, un petit nombre d'animaux supplémentaires est prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion; ceux qui ne sont pas utilisés, peuvent être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet.

Dans tous les cas, les animaux supplémentaires non inclus dans une procédure expérimentale sont euthanasiés et éventuellement utilisés pour produire des matrices biologiques, indispensables aux activités de bioanalyse.

246- Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de décès dans le monde. L'infarctus du myocarde, malgré des progrès importants en termes de prise en charge, demeure le premier pourvoyeur de morbi-mortalité. La réponse inflammatoire joue un rôle important dans la physiopathologie de cette maladie.

TREM-1 est un immuno-récepteur impliqué dans l'amplification de la réponse immune au cours de nombreuses affections. Au sein du laboratoire nous avons développé un peptide (LR12) permettant la modulation de TREM-1 et avons démontré son efficacité thérapeutique au cours de différentes maladies inflammatoires.

Ce projet vise à étudier les effets de ce peptide au cours de l'infarctus du myocarde chez le cochon. En effet, si l'emploi de petits animaux, rongeurs en particulier, permet d'émettre des hypothèses pathophysiologiques, leur confirmation requiert l'emploi de

modèles expérimentaux plus proches de la pathologie humaine : de part la grande similitude qui existe entre cochon et homme en terme de système cardio-vasculaire, l'étude sur cet animal nous semble donc pertinente.

Après stabulation 1-2 semaines en groupe dans un box enrichi par des jouets adaptés (balles..), un infarctus du myocarde sera induit par la mise en place sous scopie d'un ballonnet dans l'artère coronaire gauche de 20 cochons anesthésiés par nesdonal et sufentanil. Les animaux seront randomisés pour recevoir le traitement LR12 ou son placebo par voie intra veineuse.

La prise en charge est ensuite identique à celle d'un patient (maintien de la volémie, de la pression artérielle moyenne, d'un débit cardiaque adéquat) et sera assurée par un réanimateur expérimenté.

Des prélèvements biologiques (effectués via un cathéter artériel) seront analysés sur place et permettront de guider la prise en charge : gaz du sang, lactatémie, ionogramme, numération sanguine

Au bout de 18 heures de traitement, l'animal sera sacrifié par administration de 20g de KCl iv sous anesthésie profonde par Nesdonal. Au cours de l'expérimentation, si la pression artérielle moyenne demeure inférieure à 50 mmHg durant plus de 30 mn malgré un support vasopresseur maximal autorisé l'animal sera sacrifié de la même façon.

La douleur et l'anxiété éventuelles sont en permanence maîtrisées par l'anesthésie générale (nesdonal et sufentanil).

La mise en évidence d'un effet cardio-protecteur de notre peptide pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques chez l'homme.

247- Les tumeurs cérébrales constituent un véritable défi pour les chercheurs et oncologues car, malgré des traitements lourds (incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie avec le Témazolomide (TMZ), le taux de mortalité reste très élevé (>90%) et pour les formes les plus graves, la mort survient très rapidement après le diagnostic (12 à 15 mois). Il est donc primordial de proposer de nouvelles approches thérapeutiques susceptibles d'améliorer l'issue de ces pathologies et d'identifier des marqueurs capables de prédire la réponse de ces tumeurs aux traitements.

Préalablement, des travaux in vitro sur cultures cellulaires ont permis d'accumuler des résultats encourageants concernant l'implication de l'intégrine  $\alpha 5$  (ITG  $\alpha 5$ ) dans le développement et la réponse aux traitements des tumeurs cérébrales les plus graves, et ce, en fonction de leur statut p53.

Parallèlement, l'intégrine  $\alpha 5$  pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique. Dans ce contexte, des nouvelles molécules (dont le K34c) capables d'inhiber l'ITG  $\alpha 5$  ont été synthétisées. Ces molécules sont capables in vitro sur cultures cellulaires d'augmenter l'effet anticancéreux du TMZ. En effet, les inhibiteurs de l'ITG  $\alpha 5$  augmentent la mort des cellules tumorales lorsque ces dernières sont traitées en même temps par TMZ.

Il est nécessaire désormais de valider ces résultats in vivo chez l'animal afin de prendre en compte les cellules tumorales dans leur environnement, et notamment lorsqu'elles sont au contact des cellules endothéliales qui expriment elles aussi cette intégrine. C'est l'objectif de ce projet.

Pour nos expérimentations, nous serons amenés à utiliser 174 souris immunodéprimées (NMRI-nude) porteuses de tumeurs humaines xénotreffées et qui seront soumises à différentes stratégies thérapeutiques. Nous analyserons les effets des traitements sur les tumeurs aux plans clinique, histologique et biologique. De fait, l'ensemble des animaux seront mis à mort par injection d'une dose létale d'anesthésique (pentobarbital sodique) en fin d'études et feront l'objet de prélèvements de tissus. Les résultats de cette étude serviront de bases rationnelles pour proposer, ou non, une nouvelle stratégie thérapeutique pour des essais thérapeutiques.

Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster (à la baisse) le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés lors de la première série (Réduction). Par ailleurs, ces expérimentations viennent en complément de nombreuses expérimentations in vitro qui nous ont permis de poser nos hypothèses de travail : néanmoins, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans le domaine de l'oncologie. Enfin, en conformité avec la règle des 3R, les animaux sont placés en cages multiples et le bien-être des animaux fait l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

248- Ce projet est réalisé dans le cadre d'un enseignement technique et de formation professionnelle conduisant à des métiers de techniciens supérieurs qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux, des traitements d'animaux, des observations cliniques.

Les objectifs de ce projet sont uniquement pédagogiques, ils consistent à :

Initier les étudiants à la manipulation du rat vigile adulte (préhension, pesée, identification, contention).

- Apprendre la technique d'administration par voie intrapéritonéale.

Réaliser une anesthésie par voie parentérale avec l'association kétamine /xylazine à raison d'un rat par étudiant.

- Apprendre à reconnaître les signes cliniques permettant d'évaluer le temps d'induction d'une anesthésie, sa profondeur et sa durée d'action chez le rat.

- Sensibiliser les étudiants à l'importance de la surveillance d'un animal anesthésié.

- Acquérir un comportement éthique en expérimentation animale.

25 rats d'environ 150 g seront utilisés par année universitaire pour 50 étudiants soit

125 animaux pour 5 ans.

Tous les animaux utilisés une 1<sup>ère</sup> fois dans le 1<sup>er</sup> groupe d'étudiants sont en effet réutilisés une 2<sup>ème</sup> fois par le 2<sup>ème</sup> groupe d'étudiants. Les animaux sont hébergés conformément à la réglementation en vigueur. Le milieu est enrichi physiquement en

introduisant dans les cages, des tubes en PVC formant des tunnels et leur donnant ainsi la possibilité de se cacher. Un fond musical est mis en place pour stabiliser l'environnement sonore.

249- Le développement de modèles mathématiques permettant de prédire correctement des réponses biologiques est un objectif majeur permettant à terme de réduire les quantités d'animaux utilisés à des fins de recherche. Cependant ces modèles mathématiques doivent impérativement être validés par confrontation à des données expérimentales. Nous nous proposons donc de réaliser des expériences de retour à un hématoците normal après une anémie induite chez la souris. Le dispositif expérimental sera adapté à capturer correctement des données quantitatives et cinétiques qui permettront 1. De valider/invalider le modèle mathématique et si le modèle est validé 2. D'affiner les valeurs paramétriques. Ce projet devra permettre de compléter le « cercle vertueux » à la base de la biologie des systèmes en retournant tester de manière expérimentale des prédictions du modèle mathématique.

250- De nombreux animaux connaissent une reproduction saisonnée. Cette saisonnalité est en général sous le contrôle de facteurs externes dont le plus important est la photopériode. Les variations de la photopériode se traduisent par des variations au niveau cérébral, notamment en termes de plasticité neurobiologique. Un exemple d'une telle plasticité cérébrale est celui des oiseaux chanteurs. En effet, les structures cérébrales responsables du comportement de chant croissent lors de la période de chant au printemps. Cette croissance est sous la dépendance de processus de neurogenèse cérébrale et de l'augmentation des taux circulants d'hormones stéroïdes.

Dans cette étude, nous voulons étudier les phénomènes de plasticité du cerveau chez un autre modèle saisonnier, les ongulés (et en particulier la brebis) pour lequel nous savons que des processus de type neurogenèse existent aussi et varient au cours de la saison sous l'influence des taux circulants de stéroïdes sexuels. Pour cela, nous voulons suivre de manière longitudinale l'évolution de l'anatomie cérébrale par une approche non invasive, de type imagerie par résonance magnétique (IRM) au cours d'un cycle annuel de reproduction. Ces nouvelles approches d'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettent une approche plus globale du système nerveux et ce, de manière non invasive pour les animaux.

Dans ce cadre, nous mesurerons le volume de différentes structures cérébrales et l'intensité de différents faisceaux de fibres nerveuses au cours de l'année (notamment séquences de type anatomiques T1 (relaxation longitudinale), T2 (relaxation transversale) et DTI (imagerie de diffusion)). Nous centrerons ces mesures en particulier sur les zones hypothalamiques qui sont le siège des processus d'intégration photopériodique. A cette fin, les animaux (n=20), hébergés en photopériode naturelle, seront suivis de manière longitudinale et imagés de manière régulière au cours de l'année. L'utilisation d'une approche d'IRM est une approche non invasive et qui permet le suivi longitudinal des animaux, en ce sens elle permet d'économiser un nombre important d'animaux en comparaison des approches histologiques habituelles.

251- L'inflammation est une réaction de l'organisme indispensable pour la protection contre les infections et la réparation des tissus endommagés par ces infections ou par divers traumatismes. Elle est cependant nocive lorsque son intensité est excessive ou sa durée exagérée. L'inflammation participe ainsi au développement de maladies chroniques comme l'athérosclérose, le diabète de type 2 ou la maladie d'Alzheimer. C'est la raison pour laquelle la recherche biomédicale tente d'identifier les cibles de nouveaux traitements anti-inflammatoires. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à une famille d'enzymes protéolytiques (c'est-à-dire capables de dégrader certaines protéines), les calpaïnes. Elles sont présentes dans le cytoplasme de la plupart des cellules où leur activité est augmentée par le calcium et limitée par la calpastatine. Notre équipe a développé des souris transgéniques dont tous les tissus expriment la calpastatine en excès et dont l'activité calpaïne est ainsi limitée. Cet outil nous a permis de démontrer que l'activation des calpaïnes au cours de l'inflammation participe aux lésions observées dans différents modèles de maladies du rein comme l'insuffisance rénale aiguë, le rejet de greffe et l'hypertension artérielle.

De manière surprenante, les calpaïnes peuvent parfois sortir de la cellule où elles sont produites et jouer un rôle bien différent de celui qu'elles exercent dans la cellule. Jusque là, de très rares travaux se sont intéressés à cette question. Nous avons été les premiers à montrer que ces enzymes une fois extériorisées favorisent la réparation de l'épithélium tubulaire à la suite d'une insuffisance rénale aiguë. Plus récemment nous avons pu montrer que les calpaïnes extracellulaires favorisent aussi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la réparation des vaisseaux lésés, par exemple dans des modèles de maladie rénale et de plaie cutanée.

Dans leur ensemble, nos études suggèrent donc que les calpaïnes intracellulaires favorisent le développement de la réaction inflammatoire alors que les calpaïnes extracellulaires accélèrent la réparation des tissus lésés par l'inflammation. Le but de cette nouvelle étude est de déterminer

- les mécanismes de sécrétion des calpaïnes par une analyse de cellules isolées,
- les fonctions des calpaïnes extracellulaires. Dans ce but nous avons créé des souris transgéniques nouvelles. Elles expriment le gène de la calpastatine sous le contrôle du promoteur de la C Reactive Protein (CRP) humaine et d'un peptide signal. Ainsi, lors de tout stress inflammatoire, le gène est exprimé dans le foie et la protéine calpastatine sécrétée, bloquant par voie endocrine toute activité calpaïne extracellulaire, sans interférer avec les calpaïnes intracellulaires. A l'aide de cette lignée, nous déterminerons si les calpaïnes extracellulaires préviennent effectivement le développement de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde.

Le nombre estimé d'animaux est de 170 pour l'ensemble du projet, incluant les souris sauvages et les souris transgéniques. Concernant la prise en charge de la douleur, une observation du comportement des souris sera programmée régulièrement et

une injection d'antalgiques sera réalisée quand et si nécessaire. Par ailleurs, les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu comprenant :

- de la litière cellulose dont les éléments permettent aux animaux de trier les morceaux de tailles différentes, de décompacter les morceaux compactés, d'élaborer des nids
- une bûche en peuplier que les animaux peuvent ronger, déplacer ou monter dessus.

252- Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un futur projet portant sur l'impact de nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>, p25, Degussa) sur les fonctions de la barrière hémato-encéphalique et sur la répartition potentielle du titane dans le système nerveux central chez des rats adultes et âgés, exposés par voie inhalatoire à un aérosol de particules de TiO<sub>2</sub>, généré au sein du nouveau pôle implanté à l'INRS.

Dans la présente étude, nous nous sommes proposé d'étudier la translocation potentielle cérébrale de ces mêmes nanoparticules de dioxyde de titane chez le rat après instillation intra-nasale mononarinale. Cette étude permettra de savoir si le dioxyde de titane nanométrique (p25) peut migrer dans le système nerveux central par transport axonal via la voie olfactive comme cela a déjà été démontré pour d'autres oxydes métalliques (oxyde de manganèse, de cobalt...). Cette étude permettra également d'étudier la biodistribution du TiO<sub>2</sub> dans le compartiment sanguin mais également dans des structures comme le foie, les poumons et les reins. Les urines ainsi que les fèces prélevés le dernier jour d'instillation intranasale permettront également de compléter les informations sur la biodistribution du dioxyde de titane. Ce projet portant sur le transfert potentiel de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> vers le cerveau par transport axonal via le nerf olfactif ne peut être réalisé qu'in vivo en utilisant le rat comme modèle expérimental qui présente de nombreuses caractéristiques communes avec les autres mammifères, comme l'homme. En effet, il n'existe pas de modèle in vitro reproduisant le système olfactif et incluant la muqueuse, le nerf et le bulbe olfactif.

Un total de 96 rats mâles sera nécessaire pour l'ensemble du projet. Des instillations intra-nasales subaiguës pendant 10 jours seront réalisées. Nous disposerons d'un groupe témoin recevant par instillation intra-nasale mononarinale le véhicule et de deux groupes traités au TiO<sub>2</sub> à deux doses. Les rats du premier groupe recevront chaque jour par instillation la dose de 653 µg de TiO<sub>2</sub> dans un volume instillé de 30 µl. Cette dose a été estimée et calculée de manière à être proche de la limite d'exposition professionnelle. Elle correspond à la quantité de dioxyde de titane qu'un rat de 300 g exposé à la valeur limite d'exposition du dioxyde de titane (10 mg/m<sup>3</sup>) inhalerait sur une période de huit heures (fréquence respiratoire : 85 cycles/minute et volume tidal : 1,6 ml). Les rats du second groupe recevront une dose deux fois plus élevée. Le dernier jour d'instillation, les rats témoins et traités seront placés dans les cages à métabolisme de manière à prélever les urines et fèces. Vingt-quatre heures après la dernière instillation, les rats seront profondément anesthésiés pour prélever le sang puis les structures cérébrales (bulbe olfactif, hippocampe, cortex frontal) seront prélevées du côté ipsilatéral et controlatéral à la narine instillée ainsi que le cervelet. Par ailleurs, les poumons, le foie et les reins seront également prélevés. Le titane sera par la suite dosé dans ces différentes structures par spectrométrie de masse à plasma induit par haute fréquence (ICP-MS).

253- Le but de ce projet est d'étudier le rôle de certains gènes dans le développement de la maladie rénale liée à l'hypertension pour proposer ensuite de nouvelles cibles thérapeutiques. L'hypertension touche une partie importante de la population, actuellement les traitements donnés chez l'homme suffisent à faire baisser la pression artérielle mais ces traitements sont insuffisants pour éviter certaines lésions rénales et vasculaires. Notre projet tente de mettre en évidence des nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer les traitements et éviter à plus long terme la dialyse ou la transplantation. Les modèles d'hypertension chez le rat sont étudiés dans notre laboratoire depuis très longtemps, ils sont peu douloureux pour l'animal et miment assez bien la pathologie humaine. Nous allons bloquer l'expression de certains gènes déjà étudiés dans notre laboratoire et observer si ce blocage a un effet bénéfique sur la progression ou la régression de la maladie rénale hypertensive. Le nombre d'animaux total est évalué à 180 pour ce projet. Respectant la règle des 3R nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux par groupe, nous nous efforçons également de respecter les points limites et de réduire la douleur sachant que les modèles étudiés ici sont peu douloureux (la chirurgie sous cutanée n'entraîne pas de douleur chronique et nous avons ajouté par précaution un traitement analgésique). Nous effectuons des expériences complémentaires sur des lignées cellulaires (in vitro) pour détailler les mécanismes d'action afin d'éviter des groupes d'animaux supplémentaires.

254- L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé public dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 2,5 millions de personnes. Malgré le progrès accomplis par la médecine moderne les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces. En effet, les malades qui arrivent en stade terminal sont au nombre de 70000 environ, ce qui représente 2% des dépenses d'assurance maladie. De plus cette population augmente de 3% par an pour les patients dialysés et 5% pour les patients greffés. Le but de ce projet est d'étudier le rôle de 4 nouveaux gènes impliqués dans le développement de la maladie rénale. Pour cela nous disposons de plusieurs modèles animaux qui permettent de travailler sur différents types de pathologies rénales comme l'hypertension ou encore certaines complications associées à la transplantation. Dans un second temps, nous évaluerons l'effet de l'inhibition de ces gènes sur le développement de la maladie rénale. Afin de d'étudier le potentiel thérapeutique de ces nouveaux gènes nous avons établi quatre différents protocoles de néphropathie que l'on appliquera en utilisant 2050 souris génétiquement modifiés durant une période de 5 ans. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des " 3 R ". De cette manière, nous espérons découvrir des nouvelles cibles thérapeutiques et développer des nouveaux médicaments pour éviter aux patients la dialyse ou à terme la transplantation.

255- La caudectomie et la castration sont des procédures réalisées régulièrement et sous conditions réglementaires par les éleveurs de porc (directive 98/120/CE), afin de réduire les risques de caudophagie en phase d'engraissement (caudectomie), sources de douleurs importantes, et les risques d'odeur dans la viande à la cuisson (castration).

Ces pratiques sont douloureuses pour l'animal et remises en cause. Actuellement, les éleveurs de porc utilisent un antalgique de type anti inflammatoire non stéroïdien, le méloxicam, pour réduire la douleur liée à la castration. Ce traitement permet de réduire la douleur post-opératoire. Il pourrait également réduire la douleur due à la caudectomie; dans ce cas, caudectomie et castration pourraient être effectuées au même moment pour l'animal, sous méloxicam. La prise en compte de la douleur par le méloxicam lors de l'acte opératoire proprement dit est cependant insuffisante.

L'utilisation des traitements pharmacologiques permettant de la réduire est très réglementée et les éleveurs disposent de très peu de moyens thérapeutiques. Le butorphanol, dérivé opioïde qui a des propriétés analgésiques et légèrement sédatives pourrait être utilisé, sous réserve d'être prescrit par un vétérinaire.

Cette étude se propose donc d'évaluer les effets de l'utilisation de méloxicam sur la caudectomie et les castrations, effectuées séparément ou simultanément, et de tester un protocole plus complet de prise en charge de la douleur (butorphanol et méloxicam) dans le cas où les deux interventions sont réalisées simultanément. Elle s'appuie sur des indicateurs physiologiques (une prise de sang et mesure de cortisol et d'ACTH) mesurés sur 18 animaux par traitement, ainsi que sur des indicateurs comportementaux et zootechniques (24 animaux par traitement).

256- Les parasites internes du cheval peuvent être mortels et affectent le bien-être et les performances des chevaux, même adultes. Le contrôle de ces infestations repose sur l'administration de vermifuge. Ces traitements onéreux (100€/cheval/an) sont aujourd'hui rendus inefficaces. En effet, certains parasites sont devenus résistants à toutes les molécules disponibles. La fréquence des résistances est en constante augmentation et leur diffusion est mondiale.

Cette situation préoccupante pourrait conduire à l'impossibilité de protéger les chevaux de ces parasites. Parmi ces parasites internes, les cyathostomes représentent une menace majeure pour les équidés.

Une des stratégies de gestion intégrée des parasites vise à identifier les chevaux les plus infestés et de ne traiter que ces chevaux afin de limiter les traitements appliqués.

Un marqueur immuno-diagnostique rendant compte du niveau d'infestation des chevaux a récemment été développé. Notre projet vise à valider ce marqueur et à tester ses propriétés en vue d'une application sur le terrain par les praticiens vétérinaires. Pour cela le projet consistera essentiellement en des prises de sang mensuelles sur 40 chevaux au pré. Les poulains ne seront pas séparés de leurs mères, et les prises de sang sur les jeunes seront réalisées après application percutanée d'un anesthésique local afin de réduire la douleur. En cas d'infestation trop forte, les chevaux seront vermifugés.

257- L'obésité, qui débute lors de l'enfance et perdure chez l'adulte, augmente significativement les risques de décès et représente un problème majeur de santé publique. Cette maladie est plurifactorielle et l'influence de l'environnement y tient une large place. Les patients présentent un comportement d'hyperphagie souvent ciblé sur l'ingestion de nourriture type "cafétéria" (riche en graisse et/ou en sucre). La régulation de la prise alimentaire résulte de l'intégration, au niveau du système nerveux central, non seulement de signaux endocriniens, nerveux, métabolites, mais également hédoniques. Des signaux sensoriels tels que la vue, le goût et l'odorat, participent à la décision de début et de fin de prise alimentaire.

Nous nous intéressons aux répercussions de l'installation d'un état d'obésité sur la fonction olfactive chez le rat. Nous avons montré que chez l'adulte, l'installation d'un état d'obésité en lien avec une alimentation enrichie en graisses saturées et en sucres rapides administrée après la naissance, s'accompagne d'une diminution de la perception olfactive et de sa moindre sensibilité au jeûne. Plusieurs travaux ont conduit à préconiser une alimentation enrichie en n-3 pour enrayer des obésités débutantes.

Nous avons donc envisagé d'utiliser un tel régime pour corriger les déficits olfactifs observés dans notre modèle de rat obèse. Hors, lors d'expériences antérieures sur les effets d'une alimentation périnatale enrichie en acides gras polyinsaturés sur la résistance au stress dans le cadre d'une ANR, certains de nos collègues ont observé des effets étonnants: les rats issus de mères nourries aux AGPI n-3 et eux-mêmes nourris avec ce régime, développent une hyperphagie et présentent pendant leur développement une prise de poids supérieure à celle des contrôles. Ceci se traduit par une modification de l'état métabolique de l'individu avec dérégulation de la prise alimentaire et prise anormale de poids très précocement après la naissance. Nous souhaitons donc évaluer l'évolution des capacités olfactives des animaux placés sous régime enrichi en n-3 et les conséquences de la mise en place d'un tel régime dès la période périnatale. Nous travaillerons sur une cohorte de 40 rats Wistar dès le sevrage répartis en 4 lots expérimentaux que nous suivrons sur plusieurs mois (suivi des paramètres métaboliques, comportement olfactif, injections intrapéritonéales). Le nombre d'animaux est fixé de manière à pouvoir effectuer des tests statistiques fiables tout en suivant la régie des 3R. Nous essayerons de répondre aux questions suivantes : Est-ce que le fonctionnement olfactif des rats nourris avec un régime enrichi en n-3 est affecté? Observe-t-on dans des conditions de manipulation nutritionnelle périnatale ces perturbations ? Et à partir de quel moment. Cette étude originale permettra de préciser l'intérêt de tels régimes à titre protecteur via une "récupération de la fonction olfactive" chez des animaux présentant une propension à développer une obésité.

258- Notre système de défense, le système immunitaire permet de lutter contre les microbes. Parmi les molécules qui contrôlent le système immunitaire, et principalement les lymphocytes, le TGF-beta apparaît depuis quelques années comme une

protéine majeure. Cependant son rôle dans la lutte contre les microbes est encore mal connu. L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle du TGF-beta dans le contrôle de la réponse des lymphocytes aux pathogènes. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, en décrivant le rôle du TGF-beta dans la lutte contre les microbes, qu'au niveau de la recherche appliquée, avec une amélioration de la vaccination. La réponse aux questions scientifiques posées implique le maintien d'une étude physiopathologique au cours de la réponse de l'organisme à l'infection par des microbes. Seul des études chez la souris, pour qui les réactifs et les agents infectieux sont adaptés, permettent de répondre au rationnel du projet dans des conditions physiopathologiques. Des groupes de 3-4 animaux, d'âges similaires seront réalisés et un duplicata des expériences princeps, assortis d'études statistiques, et des groupes contrôles communs à différentes lignées de souris seront mis en place afin d'obtenir avec un faible effectif la réponse aux questions posées. En plus des observations faites par les chercheurs une observation quotidienne des animaux par le responsable bien être sera réalisée. Pour ce projet, 160 souris seront impliquées sur une durée totale de 4 ans.

259- Le PDMS, un silicone flexible et transparent, est un matériau approuvé et déjà utilisé pour des applications médicales tels que des implants musculaires. La technologie des électrodes flexibles et étirables sur un substrat de PDMS pourrait avantageusement remplacer les électrodes en acier au sein du cerveau. Afin d'améliorer l'interaction à l'interface matériau-cellules, la surface de PDMS peut être micro-structurée pour arborer un arrangement dense de piliers d'une taille de l'ordre de quelques microns. Une telle géométrie a un impact mécanique et topographique sur les cellules gliales et neuronales. Des expériences préliminaires *in vitro* ont permis de constater plusieurs effets, dont un alignement des neurites sur le réseau de piliers. De plus, ces expériences en culture de cellules hippocampiques ont permis de montrer que les électrodes flexibles et étirables sur un substrat de PDMS sont bien tolérées par du tissu nerveux et qu'une pousse cellulaire se fait dans des conditions optimales. Afin de poursuivre la caractérisation de ces microstructures, une étude de leurs effets *in vivo* est désormais nécessaire. L'objectif étant d'utiliser ces électrodes chez l'animal, et peut-être un jour chez l'homme, il devient nécessaire de vérifier leur biocompatibilité sur une petite série de rats (n=3). D'après notre expérience, ce type de procédure n'est pas létal et ne nécessite pas de prévoir des animaux supplémentaires à ce stade. De plus, ce nombre est suffisant pour réaliser des marquages immunohistochimiques pouvant mettre en évidence une réaction inflammatoire et/ou une réaction astrocytaire et aucune perte animale n'est prévue. L'interruption des expériences en cours pourra toutefois intervenir au cours de la chirurgie (dans le cas où la température de l'animal ne serait pas maintenue par exemple) ou lors de la période chronique en cas d'apparition de signes indicatifs de gêne ou de douleurs persistantes (apparence du pelage, perte de poids supérieure à 20%, prostration) et/ou des signes de douleur (réactivité anormale à la manipulation, vocalisations). L'implantation de prototypes de 2x2x0,2 mm dans l'épaisseur du cortex de rat permettra d'évaluer la réponse inflammatoire sur les deux faces des électrodes et en fonction de la présence ou non de micro-piliers. L'épaisseur du prototype est équivalente au diamètre des électrodes qui sont généralement utilisées dans de telles procédures. Une telle réponse est généralement observée dans les 2 semaines suivant l'implantation et ne justifie pas une période plus longue. La mise en évidence de l'inflammation éventuelle se fera par marquage immunohistologique après sacrifice des animaux par perfusion intracardiaque de PFA.

260- L'utilisation d'implants dentaires en titane placés dans l'os des mâchoires permet de remplacer des dents absentes. Cette méthode est aujourd'hui validée par la communauté scientifique. La principale limite technique aux implants dentaires est un volume osseux insuffisant et il est alors nécessaire de procéder à des greffes osseuses. La résorption osseuse des maxillaires est un phénomène naturel lié à divers facteurs locaux ou généraux. Il est possible de limiter cette résorption osseuse grâce au comblement des alvéoles dentaires au moment de l'extraction de la dent, à l'aide d'os autogène ou de biomatériaux. L'os autogène est le plus efficace, mais son prélèvement peut entraîner des complications locales et il n'est disponible qu'en quantité limitée. Des biomatériaux naturels ou synthétiques peuvent également être utilisés. Les biomatériaux disponibles permettent de guider la formation osseuse (ostéo-conduction) mais ils n'induisent pas la régénération osseuse (ostéo-induction). Les matériaux sous forme de poudre ou de granules sont souvent difficiles à manipuler, aboutissant à un comblement incomplet ou en excès. Il est donc intéressant de développer un matériau injectable qui possède des propriétés d'ostéo-conduction et d'ostéo-induction. Nous avons montré préalablement qu'un biomatériau composite (polymère - phosphate de calcium) sous forme de blocs était ostéoconducteur et ostéoinducteur chez le petit et le gros animal. Ce matériau a été rendu injectable et les résultats sur le petit animal (rat) ont montré qu'une régénération osseuse complète apparaissait à son contact. Nous souhaitons maintenant évaluer l'intérêt d'utiliser ce matériau injectable pour la régénération osseuse dans deux modèles précliniques intra-oraux chez la brebis. Le premier modèle consiste à réaliser des défauts osseux sur la mandibule de brebis et d'évaluer l'apport d'un biomatériau « test » pour la cicatrisation. Les sites « contrôle » seront laissés vides ou bien comblés avec un matériau de référence. Douze brebis seront utilisées pour cette expérimentation. Le second modèle qui sera réalisé dans le même temps opératoire chez les mêmes animaux est le comblement du plancher du sinus maxillaire (Sinus Lift). Le matériau « test » sera comparé à matériau commercial utilisé dans cette indication. Deux temps de sacrifice sont prévus (3 et 6 mois), ce qui nous permettra d'analyser 12 échantillons par condition et par temps pour la première procédure (comblement osseux mandibulaires) et 6 échantillons par temps et par condition pour la seconde procédure (Sinus Lift). La brebis est le meilleur modèle pour l'étude de la régénération osseuse préimplantaire du sinus maxillaire. Le modèle de régénération mandibulaire a également été décrit chez la brebis. Cependant, ce matériau n'a jamais été évalué chez le gros animal pour ces indications. Il est indispensable de réaliser cette expérimentation avant de passer à des essais clinique chez l'homme afin de valider l'efficacité de ce matériau dans cette indication. Le nombre d'animaux a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante permettant de conclure sur l'efficacité de cette procédure. Les expérimentations seront conduites dans un établissement



spécialisé, habitué à la gestion de ce type d'animaux et de chirurgies. L'analgésie post-opératoire et le suivi des animaux seront effectués par des vétérinaires spécialisés. Les points limites ont été définis précisément dans le protocole.

261- Notre programme de recherche a pour objectif le contrôle de la fertilité des poissons d'élevage, dans un contexte de durabilité de l'aquaculture.

Chez les animaux adultes le maintien des organes repose sur l'aptitude des "cellules souches" à reconstituer les réserves de cellules différenciées - lesquelles disparaissent en permanence du fait du vieillissement ou de leur excrétion (cas des spermatozoïdes). Notre équipe a entrepris la caractérisation des cellules potentiellement "souches" de la gamétogenèse chez les poissons, et l'analyse de leurs régulations par les facteurs testiculaires.

Dans les expérimentations décrites ici, il s'agit d'étudier, chez la truite arc-en-ciel, l'aptitude "souche" des cellules germinales : c'est-à-dire de tester la capacité de cellules isolées à partir des gonades d'un donneur- à coloniser la gonade d'un individu "receveur", puis à proliférer et générer des spermatozoïdes chez le receveur. Chez la truite, nous avons opté pour la transplantation des cellules "donneuses" dans la cavité abdominale d'un embryon "receveur" juste avant l'éclosion, une méthode développée avec succès par une équipe Japonaise. Le succès de l'opération tient au fait qu'on transplante à un stade de développement où le processus de migration des cellules germinales endogènes vers la gonade n'est pas terminé et où il n'y a pas de rejet des cellules souches étrangères.

Ce projet nécessite la manipulation de différents types d'animaux :

1) adultes -pour fournir les gamètes nécessaires à la production des embryons "receveurs" et pour prélever des testicules après euthanasie, afin d'en isoler les cellules germinales souches "donneuses"

2) la micromanipulation d'embryons à un stade non-autonome, où seront transplantées les cellules à tester 3) pour chaque lot expérimental d'embryons transplantés, nous poursuivrons l'élevage en conditions classiques jusqu'au stade alevin ou adulte afin d'analyser le taux de succès de la colonisation des gonades "receveuses" par les cellules "donneuses"

Règle des 3R : Concernant la méthode de transplantation, il existe des méthodes alternatives sur poissons adultes mais elles sont peu efficaces et impliquent des procédures susceptibles d'altérer les receveurs et d'entraîner de la douleur. Les nombres d'embryons utilisés ici sont optimisés pour permettre une évaluation quantitative du succès de la colonisation - et donc une évaluation quantitative du caractère "souche" des populations cellulaires étudiées-. 4 catégories de cellules germinales seront isolées afin de comparer leur caractère "souche" et 3 répétitions seront nécessaires par catégorie de cellules pour assurer la signification statistique des différences observées

Il est très difficile d'évaluer la douleur chez les poissons. Les manipulations des embryons se feront sous anesthésie. Les expériences préliminaires montrent que les individus transplantés semblent se développer normalement et ont des poids et taille normaux. Point limite : Les larves ou alevins malformés et susceptibles de souffrances physiologiques aux stades ultérieurs de développement seront euthanasiés.

262- 1-Objectif scientifique du projet:

La protéine Y est surexprimée dans différents types de tumeurs pour permettre la survie des cellules cancéreuses. Cette protéine constitue donc une cible thérapeutique anti-cancéreuse attractive. Un nouvel anticorps bloquant (désigné ci-après sous le terme composé X) a été développé pour inhiber les fonctions de la protéine Y. Il a été montré que le composé X pouvait efficacement inhiber l'effet oncogénique de la protéine Y dans les neuroblastomes, les cancers du sein métastatiques et certains cancers du poumon grâce à des expériences in vitro et in vivo.

Des travaux préliminaires ont également montré que la protéine Y n'était pas produite dans le pancréas normal mais était progressivement exprimée dans les lésions pancréatiques précancéreuses et cancéreuses.

L'objectif de ce protocole est de tester in vivo l'efficacité du composé X au cours de la transformation tumorale du pancréas exocrine. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées développant des lésions précancéreuses au niveau de leur pancréas.

Un modèle de tumeur fraîche d'adénocarcinome du pancréas sera aussi réalisé pour permettre des études in vivo de l'efficacité du composé X sur une tumeur solide déjà établie.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

L'adénocarcinome du pancréas est une tumeur solide très agressive représentant la 5<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer et résistante à tous les traitements conventionnels. La moitié des patients décède moins de six mois après le diagnostic ce qui fait de l'adénocarcinome du pancréas l'une des tumeurs au pronostic le plus sombre. La caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas représente donc un réel enjeu clinique pour les années à venir.

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

Seul un modèle murin peut permettre de tester si le composé X peut efficacement ralentir ou inhiber in vivo le développement des lésions précancéreuses pancréatiques et s'il peut favoriser la régression de lésions existantes.

Le modèle murin que nous avons choisi pour réaliser cette étude reproduit parfaitement la pathologie humaine puisque c'est l'introduction d'une mutation retrouvée dans plus de 90% des patients atteints de cancer du pancréas qui induit la formation des lésions précancéreuses chez la souris.

Afin de déterminer l'efficacité anti-tumorale du composé X et de tester son efficacité sur des lésions établies, un lot de souris sera traité sur une période de 8 semaines à l'âge de 2 mois, c'est-à-dire à un stade où les lésions précancéreuses commencent à

s'établir. Ces souris seront traitées soit avec le composé X (groupe traité), soit avec un composé inerte (groupe placebo). A l'issue de cette période, les souris seront mises à mort (à l'âge de 16 semaines) et les pancréas prélevés sur les souris de chacun des deux groupes seront comparés.

Deux facteurs objectifs seront pris en compte afin de déterminer si le traitement est efficace: 1) Le nombre de lésions précancéreuses par unité de surface de pancréas; 2) Les proportions des lésions de chaque grade (grades 1A, 1 B, 2 et 3).

A l'image de ce qui est observé chez l'humain, les lésions précancéreuses pancréatiques qui se développent chez les souris génétiquement modifiées sont microscopiques. Elles sont indolores et n'entraînent aucun signe clinique.

Une expérience "pilote" sera effectuée sur 6 animaux (3 animaux traités et 3 animaux traités placebo). Cette expérience permettra de collecter de précieuses informations concernant i) la mise en œuvre du protocole expérimental; ii) la tolérance des souris au traitement (dosage et innocuité); iii) l'effet potentiel du composé X.

Suite à l'expérience « pilote », nous réaliserons une expérience " de validation" (10 souris traitées et 10 souris non-traitées) qui permettra une interprétation statistique des résultats.

Un modèle de greffe de tumeur fraîche d'adénocarcinome de pancréas murin sera aussi réalisé pour permettre de valider l'efficacité in vivo de la molécule X sur une tumeur déjà établie.

- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 208 souris seront utilisées dont 26 ayant le bon génotype pour les expériences « pilote » et « de validation ». Ces souris d'intérêt seront générées par nos soins (élevage nécessitant 1 génération de croisement). Les souris n'ayant pas le génotype Cre/Kras<sup>LSL-G12D</sup>/protéine Y<sup>+/-</sup> seront soit mises à mort, soit utilisées pour renouveler les animaux « fondateurs ». Ces animaux seront sacrifiés avant l'apparition d'un phénotype dommageable (6 mois).

Au total, 50 souris Swiss/nude seront utilisées pour la mise au point du modèle de tumeur fraîche.

263- Au cours des 20 dernières années, la résistance aux antibiotiques a considérablement évolué alors que parallèlement la recherche de nouveaux antibiotiques s'est essouffée. L'émergence de bactéries dites toto-résistantes est devenu une préoccupation des pouvoirs publics. L'utilisation d'alternative aux antibiotiques devient aujourd'hui une priorité de santé publique. Une nouvelle formulation testée préalablement in vitro par un groupe pharmaceutique a fait l'objet d'une présentation au congrès de l'ICAAC en 2012. Les résultats ont été suffisamment convaincants pour développer un projet d'étude in vivo de ce produit pour ses propriétés intrinsèques antibactériennes et de synergie in vitro avec les antibiotiques. L'utilisation des modèles animaux dans le cadre des anti-infectieux est un passage indispensable de la phase préclinique d'évaluation. Les tests in vitro ont été validés (étude des CMI d'une population bactérienne étude de la cinétique de bactéricidie ...). Une première étude a donc débuté en 2012 et réalisé dans le cadre d'un modèle expérimental de pneumopathie murine à *Acinetobacter baumannii* souche SAN, validé et publié antérieurement pour les essais thérapeutiques. Il s'agit d'un modèle aigu compartimentalisé de pneumonie qui garanti l'efficacité clinique des produits testés et donne des informations sur la pharmacocinétique sanguine et pulmonaire des produits testés. La justification du modèle de pneumonie est liée à l'importance de cette pathologie en milieu hospitalier particulièrement avec des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le choix de la souche d'*Acinetobacter* est en lien avec cette multirésistance et le tropisme pulmonaire.

S'agissant d'une pathologie infectieuse aiguë, il y a une mortalité importante. Comme dans le cadre des pathologies infectieuses, ces animaux survivants ne peuvent resservir à d'autres expérimentations en raison du développement de défenses immunitaires au cours de cette maladie. Nous utilisons 15 souris par groupe thérapeutique pour l'étude clinique et 15 souris pour l'étude microbiologique et pharmacocinétique.

Les marqueurs d'efficacité relevés dans ce modèle seront:

-taux de survie

-poids

-état clinique

-compte bactérien pulmonaire (poumon, rate et sang)

-Pharmacocinétique.

La première expérimentation a testé une souche sensible au méropénème et à l'amikacine et a testé l'efficacité in vivo du produit FAB Pharma et de ces deux produits seuls ou en association.

Les résultats ont été suffisamment convaincants pour être acceptés en présentation à l'ICAAC

(International Congress of antimicrobial agent and chemotherapy, Denver US) en septembre 2013. Le projet présenté dans cette saisine approfondit l'intérêt de cette molécule sur des souches multirésistantes d'*Acinetobacter baumannii* dites "BHR" (bactéries hautement résistantes) en traitant avec le produit FAB Pharma, le méropénème ou la colistine seules ou associés. Un volet d'expérimentation représentant le module 1 de cette étude a déjà été adressé en saisine en avril 2013 (attente de réponse). Les 4 modules suivants sont présentés ici.

264- La souris « Flacky skin », présente une anomalie dans le gène codant pour la protéine TTC7A, qui est apparue spontanément. Cette souris « Flacky skin » présente une pathologie de la peau ressemblant à un psoriasis, une pathologie du système immunitaire, et une pathologie du tractus gastro-intestinal. La fonction de la protéine TTC7A et son rôle dans l'expression de ces différents symptômes ne sont pas connus. Très récemment, nous avons identifié chez plusieurs patients, une pathologie héréditaire similaire, qui résulte également d'anomalies du gène TTC7A. Ces patients présentent en particulier une pathologie immunitaire, cutanée et surtout intestinale réfractaire aux traitements actuellement disponibles. Notre projet de recherche vise à utiliser le modèle murin de la souris « Flacky skin », dans le but de mieux comprendre la fonction de la protéine

TTC7A et les mécanismes par lesquels son défaut conduit aux manifestations observées chez les patients. La souris « Flacky skin » sera utilisée d'une part pour mieux étudier les caractéristiques de l'atteinte cutanée, immunitaire et gastrique, par l'observation et la caractérisation cellulaire et histologique des différents tissus et organes affectés. Ces études seront réalisées sur animaux euthanasiés. Les études jusque là réalisées *in vitro* sur les cellules de patients suggèrent qu'une voie d'activation cellulaire commune à tous ces tissus pourrait être perturbée par l'anomalie de TTC7A. Un deuxième axe du travail de recherche tentera d'utiliser un inhibiteur connu de cette voie d'activation, pour essayer de corriger les symptômes de la maladie chez ce mutant. Cet inhibiteur a déjà été utilisé pour d'autres applications chez la souris, sans présenter d'effet secondaire particulier chez les animaux traités. Il sera utilisé dans les mêmes concentrations dans le cadre de ce projet. Les approches expérimentales utilisées consisteront essentiellement en des injections uniques ou espacées de l'inhibiteur par voie veineuse ou intra péritonéale. Si ce composé s'avère efficace, ces résultats seront transposés chez l'homme. Cette étude représente une approche thérapeutique préclinique de cette pathologie. En conformation avec la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement), le nombre de souris sera calculé au plus juste (130 souris) et utilisé uniquement quand un modèle d'étude *in vivo* s'avère indispensable pour répondre à la question posée. Le programme de croisement des animaux sera précisément défini pour éviter la génération d'un nombre excessif d'animaux. Des études cellulaires *in vitro* seront utilisées en remplacement des modèles *in vivo* à chaque fois que possible.

265- Le paludisme est une affection causée par des parasites du genre *Plasmodium* et transmise par des moustiques du genre *Anophèles*. Cette maladie provoque chaque année dans le monde la mort de près d'un million de personnes, principalement des jeunes enfants et des femmes enceintes, Les inconvénients liés à l'utilisation d'insecticides (apparition de moustiques résistants, destruction de nombreuses autres espèces animales) et la difficulté technique que représente la création d'un vaccin efficace ont conduit la communauté scientifique à rechercher de nouvelles stratégies de lutte contre ce fléau.

La thématique de recherche de notre laboratoire trouve son origine dans une observation: si dans une même population d'*Anophèles* la majorité des moustiques sont de parfaits vecteurs de *Plasmodium*, un certain nombre d'individus sont capables d'éliminer de leur organisme ces parasites, Il a été montré que cette résistance naturelle a en partie une origine génétique. Ainsi, notre objectif est de mieux comprendre le fonctionnement des gènes de l'immunité des moustiques afin d'envisager des méthodes basées sur le renforcement de la résistance des moustiques des populations naturelles, ce qui permettrait de réduire la propagation de la maladie. Le travail sur le parasite humain, *Plasmodium falciparum*, nécessitant des laboratoires avec des niveaux de confinements élevés, de nombreuses équipes ont choisi de travailler sur des modèles murins du paludisme: *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii*, Cette démarche scientifique implique donc l'utilisation de souris comme hôtes de parasites, D'autre part, les moustiques femelles sont des hématophages obligatoires: elles ont besoin de repas sanguins pour être capables de produire des œufs, Des souris sont donc également requises comme donneuses de sang pour le maintien des colonies,

Nous avons établi nos protocoles en conformité avec les exigences de remplacement, réduction et de raffinement:

- l'utilisation des souris ne peut être remplacée par la technique de repas sanguin sur membrane artificielle avec du sang humain, du fait du nombre important de lignées, et de la nécessité de conserver le même régime alimentaire pour tous nos moustiques,
- afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, chaque souris est utilisée pour plusieurs repas sanguins non infectieux avec 1 mois d'intervalle entre 2 repas,
- toute souris infectée est mise à mort avant qu'elle ne développe les symptômes physiques d'un paludisme sévère (fièvre, anémie, troubles neurologiques),

Les repas non infectieux et infectieux se font sous anesthésie, et le nombre de moustiques se nourrissant sur une souris est strictement contrôlé (400 femelles maximum),

Il est nécessaire d'utiliser environ 400 souris par an pour maintenir les 50 lignées différentes de moustiques et 400 souris pour les infections, soit un total d'environ 800 souris par année.

266- Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur les capacités de l'organisme à réagir à une hypertension artérielle apparaissant lors de l'exposition à un challenge pharmacologique au L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) couplé à un régime hypersodique. Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux pour lesquels les techniques de mutation génétique sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du récepteur dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme ; notamment avec la mise en place du modèle d'hypertension.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées. La comparaison entre des animaux contrôles et des animaux ayant subi une mutation pour un gène particulier permet de mettre en évidence à la fois le rôle du gène dans le contrôle basal de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle ; mais aussi son influence lors de la régulation d'une hypertension.

Pour ce protocole, 32 à 80 animaux seront utilisés selon le type de mutation. En effet, dans le cadre d'une mutation constitutive, 2 groupes de 12 animaux seront utilisés expérimentalement, et afin de s'assurer d'obtenir cet effectif, 16 animaux par groupe seront prévus, afin de pallier à d'éventuels exclusions d'animaux lors de l'implantation des capteurs télémétriques. Pour des mutations inductibles, quatre groupes expérimentaux de 6 animaux sont prévus, nécessitant 40 animaux au total. La variabilité possible lors des analyses peut par la suite nécessiter de dupliquer l'expérience.

Afin d'étudier la fonction du gène d'intérêt, un modèle d'hypertension artérielle sera mis en place. Il consiste dans un premier temps dans la pose d'un implant télémétrique permettant de mesurer le rythme cardiaque et la pression artérielle sur des animaux vigiles et libres de mouvements. Ce dispositif apporte les informations les plus précises dans le cadre de l'étude de la pression artérielle, notamment grâce à l'enregistrement continu du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Cela n'est pas possible en pratiquant une mesure externe, sous contrainte.

Par la suite, ces mêmes paramètres seront mesurés après ajout du L-NAME dans l'eau de boisson et au placement sous régime hypersodique afin de constater la mise en place de l'hypertension artérielle ainsi que des mécanismes régulateurs. Ce modèle est documenté dans de nombreuses références et constitue une approche transversale et disposant d'une bonne validité de construction.

Ce projet permet, de par sa grande précision, de réduire le nombre d'animaux utilisés satisfaisant les exigences de réduction. Sa validité de construction répond aux exigences de raffinement des critères éthiques.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation.

Ce protocole pourra s'appliquer sur 20 lignées par an au sein de notre institut ce qui fera un maximum de 1600 animaux par an soit 4800 souris sur la totalité du projet.

267- Ce protocole vise à caractériser les altérations des mécanismes de régulation physiologiques de la pression artérielle déclenchés lors de l'exposition à des régimes hypersodique puis hyposodique, chez des animaux modifiés génétiquement. En effet, afin de comprendre l'implication d'un gène dans les mécanismes de régulation de la pression artérielle, et permettre ainsi de développer de nouveaux candidats médicaments ; il est indispensable de connaître leur implication dans ces processus. Pour cela, les animaux recevront des implants télémétriques permettant de mesurer chez l'animal vigile la pression artérielle ainsi que le rythme cardiaque de manière fine et sur une durée de plusieurs semaines. Une mesure des paramètres est effectuée suite à la période de repos post-opératoire. Puis, ces mêmes paramètres seront mesurés après un placement sous régime hyposodique afin de constater la mise en place des mécanismes régulateurs. Ensuite, les animaux seront nourris avec un régime hypersodique et les paramètres seront à nouveau mesurés. Enfin, les animaux seront placés sous régime standard puis sacrifiés afin de collecter le plasma et les organes nécessaires à l'étude de l'ensemble des phénotypes observés.

La comparaison de l'ensemble de ces résultats entre des animaux contrôles et des animaux mutés pour le gène d'intérêt permettra de mettre en évidence le rôle de ce dernier dans les mécanismes régulant la pression artérielle.

Pour ce type de protocole, un effectif de 12 animaux par groupe est nécessaire par génotype. 32 animaux seront utilisés tous génotypes (16 contrôles et 16 mutants), permettant ainsi d'obtenir de manière certaine les effectifs requis. En effet, malgré notre expérience dans ce type de procédure nous indiquons la nécessité d'inclure dans le protocole des animaux supplémentaires pour l'implantation des capteurs télémétriques, afin de pallier à d'éventuelles exclusions d'animaux liées à une mauvaise implantation ou à un signal instable.

Cette démarche s'inscrit dans un impératif de raffinement et de réduction, visant à utiliser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir au final des résultats scientifiquement probants.

Ce protocole pourra être effectué pour 20 lignées par an au sein de l'institut ce qui fera un total de 640 souris maximum par an soit 1920 animaux sur la durée du projet.

268- Ce protocole vise à caractériser les altérations des mécanismes de réponses physiologiques déclenchés lors de l'exposition à l'angiotensine II, chez des animaux modifiés génétiquement.

L'augmentation de la pression artérielle causée par l'angiotensine II déclenche un ensemble de mécanismes de contrôles internes physiologiques chez des animaux contrôles et ce protocole vise à déterminer l'implication de certains récepteurs dans cette régulation. Pour cela, les animaux recevront des implants télémétriques permettant de mesurer chez l'animal vigile la pression artérielle ainsi que la fréquence cardiaque de manière fine et sur une durée de plusieurs semaines. Une mesure des paramètres est effectuée suite à la période de repos post-opératoire. Des mini-pompes osmotiques sont ensuite implantées pour diffuser continuellement l'angiotensine II. La tension artérielle et la fréquence cardiaque sont mesurées durant les jours suivant cette implantation afin de constater la mise en place de l'hypertension artérielle ainsi que des mécanismes régulateurs. Les animaux sont ensuite sacrifiés afin de collecter le plasma et les organes nécessaires à l'étude de l'ensemble des phénotypes observés.

La comparaison entre des animaux contrôles et des animaux ayant subi une mutation pour un gène particulier permet de mettre en évidence à la fois le rôle du gène dans le contrôle basale de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle ; mais aussi son influence lors de la régulation d'une hypertension déclenchée par l'apport d'angiotensine II.

Pour ce protocole, 32 à 80 animaux seront utilisés selon le type de mutation. En effet, dans le cadre d'une mutation constitutive, 2 groupes de 12 animaux seront utilisés expérimentalement, et afin de s'assurer d'obtenir cet effectif, 16 animaux par groupe seront prévus, afin de pallier à d'éventuelles exclusions d'animaux liés aux implants télémétriques. Pour des mutations inductibles, quatre groupes expérimentaux de 6 animaux sont prévus, nécessitant 40 animaux au total. La variabilité possible lors des analyses peut par la suite nécessiter de dupliquer l'expérience.

Ces effectifs sont nécessaires et suffisants pour satisfaire nos contraintes statistiques, tout en répondant aux exigences de réduction des effectifs liées à la règle des 3R.

Ce protocole pourra être utilisé pour 20 lignées par an, fournies par nos partenaires.

269- En France, plus de 2/3 des diabétiques de type 2 sont obèses, entraînant une évolution du DT2 parallèle à celle de l'obésité. L'obésité frappe plus de 10% de la population. Elle touche autant les hommes que les femmes et concerne toutes les tranches d'âge. Obésité et DT2 majorent la morbidité et la mortalité en entraînant des désordres métaboliques dont la résistance à l'insuline des tissus périphériques (foie, muscles, tissu adipeux). La résistance à l'insuline associe des troubles sévères du métabolisme glucido-lipidique, une inflammation et un stress oxydant (SO) chroniques. Ses effets délétères sont quasiment ubiquitaires et se manifestent aussi au niveau cardiovasculaire en altérant la fonction endothéliale, l'endothélium étant la première cible de l'athéromatose, sujet du projet sur lequel je porte mon attention.

Obésité et DT2 sont en grande partie évitables car indiscutablement favorisés par l'inactivité physique et de mauvaises habitudes alimentaires. Ainsi, alimentation et activité physique interagissent sur notre santé: en termes de prévention, il est donc intéressant de considérer les interactions de ces 2 aspects de notre comportement et leur synergie éventuelle sur la santé. L'objectif de ce programme de recherche, est de préciser, in vivo, les effets respectifs et combinés de l'entraînement et d'ingrédients alimentaires à effet biologique connu (antioxydant et/ou anti-inflammatoire) sur l'amélioration des complications cardiovasculaires survenant avec l'accumulation de facteurs de risques cardiovasculaires (DT2, obésité, sédentarité, âge, ..). Ceci doit nous permettre d'affiner les préconisations hygiéno-diététiques pour la population générale, en mettant en avant le rôle de l'alimentation, de l'exercice physique, ou de leur interaction vis-à-vis de la prévention des désordres métaboliques impliqués dans l'obésité et le DT2.

Le premier volet de ce programme a porté sur la prévention secondaire de l'obésité et du DT2 par l'activité physique et l'alimentation.

Le projet déposé aujourd'hui, ou deuxième volet de ce programme, porte essentiellement sur la prévention par l'activité physique du DT2 seul, sans obésité. L'association avec un alicament fera l'objet d'une future demande d'autorisation de projet. Dans un premier temps, l'effet d'un exercice modéré, chronique de 6 semaines sera étudié sur la fonctionnalité des vaisseaux de rats sains, souche Wistar, au total 2 groupes de 10 animaux ont été constitués. Les animaux âgés de 9 semaines entrent en protocole de course chronique, ou restent sédentaires. Ils terminent tous à 15 semaines d'âge. A l'issue du protocole, les animaux sont anesthésiés pour permettre le prélèvement sanguin intracardiaque (dosage de glycémie par HPLC, insulïnémie et dosage ORAC pour le statut antioxydant) ainsi que différents organes: des anneaux d'artère mésentérique et coronaire sont prélevés pour tester la vasorelaxation endothélium-dépendante sur chacun des animaux par myographie, le myocarde gauche, l'aorte thoracique, le muscle gastrocnémien sont congelés pour dosages enzymatiques (enzymes anti-oxydantes) et densitométrie (enzymes intervenant dans la fonction endothéliales).

Dans un second temps, l'effet d'un exercice chronique de 14 semaines sera étudié en comparaison de l'exercice chronique court (6 semaines) sur des rats sains. 2 groupes sont constitués: 10 animaux sédentaires et 12 animaux entraînés. Les rats entrent dans le protocole à l'âge de 9 semaines et sortent à l'âge de 23 semaines d'âge. Les mêmes dosages seront effectués.

Dans un troisième temps, ces mêmes effets seront étudiés sur des animaux pathologiques: rats Goto-kakizaki, modèle de diabète de type 2, non obèse, sur 6 et 14 semaines d'exercice chronique soient 2 groupes de 10 et 12 rats, respectivement.

Le nombre total d'animaux utilisé dans ce protocole est de 80. Ce nombre est le minimum

requis pour mener à bien ce projet, en respectant le principe de réduction. Tout au long du protocole, le raffinement des conditions de stabulation et du protocole d'entraînement chronique est particulièrement bien respecté. L'utilisation du modèle rat ne peut être remplacé par d'autres modèles car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier.

270- 1. Objectif scientifique du projet.

L'objectif de ce projet est d'étudier la régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre et l'implication d'une protéine matricielle, le collagène XIV-A, dans ce phénomène. Le poisson zèbre à l'âge adulte est doué d'une fantastique capacité de régénération. Différentes parties du corps du poisson zèbre sont concernées et notamment les différentes nageoires, mais aussi une partie du cœur (apex), la moelle épinière et le cerveau. L'Homme, quant à lui, est seulement capable de régénérer une partie du foie et l'amputation d'un membre conduit uniquement dans le meilleur des cas à la cicatrisation. Notre objectif est de comprendre les divergences existantes entre l'Homme et le poisson zèbre en se focalisant plus spécifiquement sur les protéines matricielles, dont le Collagène XIV-A. En effet, nous avons récemment montré que ce collagène est exprimé dans une fenêtre très courte du développement du poisson zèbre (entre 18 et 48 heures post-fécondation) au niveau des épithéliums en cours de prolifération intense et que cette expression est réactivée suite à l'amputation de la nageoire (données préliminaires). Le but de ce projet est donc (1) de définir précisément le profil d'expression spatio-temporel du collagène XIV-A lors de la régénération caudale du poisson zèbre et (2) de déterminer si cette expression est essentielle à la régénération caudale.

2. Retombées attendues

Le but de ce travail est d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques pour induire la régénération chez l'Homme suite à différents traumatismes (accidentels ou professionnels).

3. Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Le nombre de poissons utilisés dans les procédures expérimentales associées à ce projet est réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux qui est évaluée à un niveau léger (absence de nécrose suite à l'amputation, absence de signes généraux évocateurs de mal-être: poissons restant au fond du bac, sans bouger, sans se nourrir).

#### 4. Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

166 poissons femelles adultes AB/Tu (6-18 mois) au total:

126 poissons dans la procédure 1

40 poissons dans la procédure 2

271- La tuberculose (TB) reste une menace majeure pour la santé publique mondiale malgré la présence sur le marché d'antibiotiques et d'un vaccin, le BCG (Bacilles 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 société 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 exprimées par différentes plateformes virales dont le virus de la Rougeole (Measles) dérivée de la souche atténuée Schwarz. 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. Les candidats vaccins dérivés de la plateforme Rougeole (MV-TB) seront destinés à améliorer la réponse immunitaire induite par le BCG, par conséquent dans un positionnement prophylactique. Plusieurs candidats vaccins MV-TB ont été produits. Afin de caractériser et de sélectionner les candidats vaccins MV-TB, l'immunogénicité induite dans des modèles animaux doit être évaluée. Ce projet vise à analyser les réponses cellulaires et humorales induites dans un modèle murin, selon trois protocoles de vaccination décrits dans ce document.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum sa souffrance.

500 souris seront nécessaires pour mener à bien cette étude.

272- Le développement de vaccins reste un enjeu sanitaire, sociétal et économique mondial puisque les vaccins actuels, basés sur la génération d'anticorps neutralisants, se sont révélés inefficaces dans la lutte contre certaines maladies, comme le SIDA ou la tuberculose. La pression de sélection permet à certains pathogènes à fort taux de mutations d'échapper à la surveillance humorale par l'expression de variants moléculaires à leur surface. Dans ces cas, le développement d'une nouvelle génération de vaccins ciblant la génération de l'immunité T CD8 devrait se révéler plus efficace. En effet, les lymphocytes T CD8 jouent un rôle majeur dans le contrôle des pathogènes intracellulaires et ciblent des déterminants antigéniques plus rarement mutés. De plus, ils sont impliqués dans le contrôle du développement et de la croissance des tumeurs.

La vaccination confère une immunité qui est basée sur la génération de lymphocytes mémoires. Ceux-ci diffèrent de leurs précurseurs naïfs par une réactivité accrue à la stimulation. La population des lymphocytes T CD8 mémoires est toutefois hautement hétérogène et les propriétés des lymphocytes mémoires qui corrélerent avec la protection de l'organisme sont encore mal connues. Ceci est notamment dû à l'absence de marqueurs moléculaires capables de prédire la génération d'une réponse immunitaire efficace. Par ailleurs, la génération de lymphocytes mémoires est un processus long qui s'étale sur plusieurs semaines, d'où de grands délais entre le test d'un produit et la lecture des résultats. Cette étude permettra, par l'identification de marqueurs prédictifs et qualitatifs de la mémoire T CD8 et l'utilisation de simulations *in silico*, d'accélérer les processus de suivi et de prise de décision dans les études précliniques et de limiter le nombre d'animaux utilisés dans ces protocoles. Le projet nécessitera l'utilisation de 3958 souris. Le choix du modèle souris est imposé par son utilisation dans les tests précliniques des compagnies pharmaceutiques et par la nécessité de pouvoir utiliser des animaux génétiquement modifiés afin de démontrer le rôle de molécules clés dans le développement d'une mémoire T CD8 efficace. La réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale qui rend impossible son étude dans des tests *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. 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 que pourraient ressentir les animaux.

273- Le pronostic de mélanome dépend de l'état d'avancement de la maladie au moment du diagnostic. La présence de métastases à distance est associée à un pronostic beaucoup plus sombre avec une survie de 6-11 mois et ce malgré l'usage de la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et de l'immunothérapie. L'objectif de ce projet est donc de développer une thérapie ciblée alternative utilisant des vecteurs non viraux chargés en petit ARN interférent (siRNA) administrables par voie intraveineuse. Nous avons déjà développé de nouveaux vecteurs pour l'administration de siRNA par voie systémique, les nanocapsules lipidiques de siRNA (LNC siRNA). Le procédé de formulation des LNC siRNA permet une production aisée de ces nouvelles formulations avec des taux d'encapsulation ainsi que des caractéristiques appropriées pour une administration par voie systémique. Nous souhaitons dorénavant tester ces LNC siRNA en étude préclinique afin de valider leur capacité à cibler le site tumoral et délivrer correctement le siRNA encapsulé au sein de cellules tumorales. Au cours de ce projet, 44 souris NMRI Nude seront utilisées. Ce projet comporte 2 phases : La première porte sur le suivi de la biodistribution des LNC siRNA pegylées vs LNC siRNA non pegylées. Après injection systémique, la biodistribution sera suivie par imagerie de biofluorescence, ceci permettra d'étudier la demi-vie ainsi que la clairance avec un nombre très réduit d'animaux grâce aux suivis par imagerie *in vivo*

non invasive. D'autre part, des prises de sang permettront de mettre en évidence une éventuelle hépatotoxicité. La seconde phase se propose d'étudier le ciblage du site tumoral. Afin de réaliser cette étude, des cellules tumorales qui expriment la luciférase seront implantées en sous-cutanée aux souris. Des LNC siRNA anti-luciférase seront injectées aux souris par voie systémique afin de tester l'efficacité de ciblage des LNC ainsi que l'efficacité du siRNA. Le suivi d'efficacité du siRNA se fera à l'aide d'un modèle luciférase et pourra ainsi être suivi dans la fluorescence par bioluminescence en imagerie in vivo non invasive sans sacrifice des animaux pour chaque temps d'analyse. Afin de réduire stress toutes les séances d'imagerie sont effectuées sous anesthésie gazeuse.

274- Le projet porte sur le développement et l'optimisation de vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes dans le cadre d'une thérapie génique de la mucoviscidose. L'objectif est d'atteindre les cellules épithéliales pulmonaires afin d'y apporter le gène correcteur de la déficience génétique. Or, il a été démontré que les lipoplexes développés localement étaient en mesure de conduire à une expression du gène rapporteur dans les pneumocytes de type II après injection systémique ainsi qu'après administration intratrachéale (travaux préliminaires non publiés). Dans le cadre de ce travail, nous souhaitons réaliser des études de biodistribution de nos molécules après administration selon une voie générale (injection systémique) ou locale (intratrachéale). Nous souhaitons également tester la possibilité de ré-administration de nos composés dans le but de restaurer et maintenir l'expression du gène d'intérêt à un niveau soutenu. Des études sur la cinétique d'expression et des effets secondaires potentiels de nos molécules seront réalisées, afin d'optimiser le travail de formulation en fonction de la voie d'administration. Cette approche sera complétée par des études d'immunohistochimie sur coupes de tissus. Pour cela, 32 souris NMRI-Nude seront utilisées au cours de ce projet. L'utilisation conjointe de l'imagerie in vivo de bioluminescence et de fluorescence ainsi que de la recherche de marqueurs de l'inflammation par de simples prises de sang permet de limiter le nombre d'animaux nécessaire. Afin de réduire stress et douleur chez les animaux, l'administration des plasmides par voie intratrachéale sera réalisée sous anesthésie. De plus, toutes les séances d'imagerie seront effectuées sous anesthésie gazeuse.

275- Ce projet consiste à évaluer l'activité anti-tumorale de candidats médicaments dans des modèles de tumeurs obtenues par greffe de matériel biologique d'origine tumorale dans les tissus superficiels de rongeurs (rat ou souris), la souris étant l'espèce animale la plus utilisée.

Une masse tumorale se forme alors progressivement au site d'implantation. Le pourcentage de prise de greffe est très variable d'un modèle à l'autre (50 à 100%) ; par conséquent il est nécessaire d'adapter le nombre d'animaux à implanter de manière à disposer d'un nombre d'animaux suffisant en cours d'étude (pour chaque étude de ce projet, il faut 10 animaux par groupe). L'efficacité anti-tumorale d'un candidat médicament est déterminée par l'évolution de la croissance tumorale chez des animaux traités par rapport à des animaux non traités ou recevant un produit de référence (en général pour chaque étude de ce projet, 4 groupes d'animaux; soit un nombre prévisionnel maximum de 4800 animaux sur 5 ans).

Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe actuellement de nombreuses questions scientifiques en oncologie, notamment concernant l'évaluation pharmacologique des candidats médicaments anti-tumoraux, auxquelles il n'est possible de répondre que par l'étude de la croissance de tumeurs in vivo. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. (Règle des 3R, remplacement, réduction et raffinement).

276- Les gliomes malins sont les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte. Les options thérapeutiques incluant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont restreintes et ces tumeurs demeurent de mauvais pronostic, incurables, avec une courbe de survie inférieure à 15 mois.

L'hétérogénéité tumorale et la régénération des tumeurs soutiennent l'hypothèse de cellules souches de gliomes (GiCs), responsables de part leurs propriétés d'autorenouvellement et de différenciation de l'initiation et de la progression tumorale. Pour contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anti-cancéreuses efficaces, l'objectif de nos études est d'identifier des facteurs capables de bloquer les propriétés souches/tumorigéniques des GiCs et d'induire un état plus différencié avec inhibition de la prolifération et de la tumorigénèse. Les glioblastomes sont des tumeurs très hétérogènes comprenant différents territoires cellulaires distincts composés de cellules différenciées ou indifférenciées. En réalisant une analyse moléculaire soustractive de ces territoires, nous avons identifié des cibles intéressantes comme par exemple le cluster miR-302-367 dont la surexpression force l'induction d'un état plus différencié, faiblement proliférant et non tumorigénique alors que le miR-18a\* contribue à la prolifération et à la tumorigénèse des GiCs. La protéine DOCK4, impliquée dans l'induction de l'expression du cluster miR-302-367 voit son expression également restreinte aux territoires plutôt différenciés de la tumeur. Tous nos candidats, ainsi que les mécanismes moléculaires (prolifération, migration, adhésion etc. ...) qui en découlent, sont dans un premier temps caractérisés in vitro puis ex-vivo sur des systèmes 3D de tissu neuraxiaux obtenus à partir de cultures de cellules souches embryonnaires ou adultes humaines. Ces techniques de substitution à l'expérimentation animale permettent de valider l'intérêt des cibles sélectionnées dans un contexte tissulaire, avant de les confirmer in vivo. Cette méthodologie a le mérite de réduire significativement le nombre d'animaux à utiliser. Nos expérimentations animales consistent en xénogreffes intracrâniennes de cellules tumorales humaines modifiées ou non par l'introduction de transgène, sh-RNA ou directement par la technique des TALENs. Nous utiliserons des souris immunodéprimées ou non. La croissance tumorale sera observée à l'aide d'un marquage luminescent sur une période de 4 à 20 semaines sans sacrifier les animaux. Cette technique d'imagerie permet également de réduire très fortement le nombre d'animaux à utiliser. Dans tous les cas les animaux seront sacrifiés dès l'apparition de signes

symptomatiques ou de troubles du comportement (perte d'équilibre, de poids, comportement anormal) témoignant d'un début de souffrance de l'animal. La caractérisation *in vivo* de nos molécules candidates va permettre d'enrichir en cibles thérapeutiques potentielles, mais aussi de mieux définir les bases moléculaires de la biogénèse et de la progression des glioblastomes.

277- Nous effectuerons ces expériences afin de mieux comprendre les bases neurobiologiques de la motivation. En plus de sa composante affective, la motivation est une fonction biologique fondamentale qui permet à un individu d'ajuster son comportement en fonction de son état interne et de son environnement. Par ailleurs, la motivation est perturbée dans de nombreuses maladies neurologiques et psychiatriques comme la maladie de Parkinson ou la dépression. Pour mieux comprendre les processus cérébraux sous tendant les aspects physiologiques et pathologiques de la motivation, nous mesurerons l'activité neuronale chez des singes entraînés à effectuer des tâches comportementales. Nous modulerons leur niveau de motivation en variant systématiquement la valeur des récompenses. Nous envisageons également de moduler leur niveau de motivation avec des drogues utilisées couramment en psychiatrie, notamment contre la dépression. Ces expériences devraient permettre à la fois une avancée dans la compréhension des bases cérébrales de la motivation, mais également de faciliter le développement de stratégies thérapeutiques pour les patients. Tous les traitements que nous effectuerons sont réversibles et les animaux sont élevés en groupe, ce qui permet un bon maintien de leurs relations sociales et ainsi de leur bien-être. Ces animaux ne devraient donc avoir aucune séquelle physique ou psychologique et nous prévoyons, à terme, de les réhabiliter dans un centre d'accueil agréé. Ces travaux seront effectués à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris), et ils devraient impliquer 8 singes rhésus (macaca Mulatta).

278- Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le principal agent responsable de la bronchiolite chez le nourrisson. Il s'agit d'une affection particulièrement contagieuse qui touche presque la totalité des enfants de moins de 2 ans et qui peut conduire à une hospitalisation du jeune enfant dans les cas les plus sévères. Par ailleurs, les enfants qui ont eu une bronchiolite sont plus sujets à développer de l'asthme en grandissant. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin pour prévenir cette infection. Notre projet vise à tester à la fois une nouvelle préparation antigénique basée sur des assemblages nanoparticulaires de la nucléoprotéine du virus, selon une technologie mise au point par l'INRA (N-VRS), et délivrée par une nouvelle méthode de vaccination sans aiguille (patches), développée par une société privée (DBV Technologies) et ce en vue du développement d'un vaccin pédiatrique. La peau de porc est considérée comme un des meilleurs modèles de peau humaine. Cette première phase expérimentale consistera à montrer que le vaccin, déposé sur patch, peut pénétrer dans la peau et être pris en charge par les cellules du système immunitaire cutané. Elle sera suivie d'une deuxième étape afin de déterminer les paramètres qualitatifs et quantitatifs de la réponse immunitaire induite.

20 porcs Large White au sevrage seront utilisés pour ce projet. Afin de réduire le nombre d'animaux chaque animal sera son propre témoin, le côté gauche recevant les patches portant le vaccin et côté droit recevant les patches avec l'excipient

279- Depuis des millénaires, les hommes et les animaux utilisent des ressources naturelles simples et peu coûteuses pour se soigner, qu'elles soient végétales ou minérales.

Parmi ces ressources, les argiles offrent des propriétés étonnantes. Considérées au sens large comme la fraction minérale et granulométrique du sol inférieure à 2  $\mu\text{m}$ , et au sens strict comme appartenant à la famille des phyllosilicates, les argiles sont des composants omniprésents à la surface de la terre. Du fait de leur structure et de leur composition chimique, ces matériaux nanoporeux sont capables d'échanger, d'absorber ou d'adsorber des molécules et des cations, ce qui les rend particulièrement intéressants pour de nombreuses applications. Dans la médecine occidentale, l'utilisation d'argiles, comme le Smecta® ou le Kaopectate®, pour soigner les diarrhées et les troubles digestifs est largement répandue, mais leur mode d'action reste peu connu. Il en est de même pour les animaux, qui, au cours de l'évolution, ont également appris à tirer profit et à sélectionner certains types d'argiles pour des raisons qui apparaissent encore très complexes et probablement multifactorielles. Les études portant sur la géophagie, définie comme la consommation régulière et intentionnelle de terres argileuses, sont nombreuses et concernent aussi bien les populations animales (oiseaux, mammifères, primates, etc.) que les populations humaines (africaines, guatémaltèques etc.). L'ingestion d'argiles fait également référence aux nombreuses études sur l'« automédication » animale, et rejoint plus généralement l'étude de la zoopharmacognosie et de l'ethnopharmacognosie, c'est-à-dire l'étude des pharmacopées ancestrales des populations animales et humaines. Diverses hypothèses sont avancées pour tenter d'expliquer les impacts de l'ingestion d'argiles ;

1) le soulagement de troubles intestinaux divers (diarrhées, gastroentérites, brûlures d'estomac, nausées...), 2) la lutte contre les parasites intestinaux, 3) la sensation de satiété provoquée par l'argile, 4) l'absorption des toxines et composés secondaires de la ration alimentaire ou encore 5) la lutte contre les déficiences minérales. Cependant, à l'heure actuelle, le bien fondé de ces hypothèses n'a pas été formellement démontré et certaines restent controversées. Il apparaît donc important de poursuivre les études sur la géophagie pour comprendre le mode d'action des argiles et développer ainsi de nouvelles alternatives thérapeutiques pour la médecine humaine et vétérinaire.

Ce projet propose d'étudier, par une approche comportementale, la géophagie chez *Macaca* spp. (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Macaca tonkeana*) sur 86 individus élevés en groupes sociaux dans des parcs boisés. Étant donné qu'aucune étude n'a à ce jour introduit des argiles naturelles dans des environnements captifs, ce projet de recherche sera le premier à notre connaissance à permettre l'étude des mécanismes sous-jacents au comportement de géophagie. Le choix de ces espèces du genre *Macaca* réside dans le fait que les macaques consomment régulièrement des argiles à l'état sauvage. Ces données



comportementales permettront de comprendre les stimuli qui poussent les individus à consommer des argiles et serviront, dans une deuxième approche, pharmacologique, de support pour étudier les interactions entre argiles et cultures cellulaires intestinales humaines (expérimentation in vitro).

280- La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies neuromusculaires chez l'enfant. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, une protéine jouant un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité de la fibre musculaire. Elle est caractérisée par des atteintes musculaires progressives et graves qui entraînent une perte de la marche généralement entre 10 et 13 ans et la nécessité d'une assistance respiratoire à partir de l'adolescence. L'atteinte du muscle cardiaque met également en jeu le pronostic vital. A ce jour,

Il n'existe pas de thérapie pour la DMD.

Notre équipe a montré une restauration efficace de la synthèse de dystrophine par saut de l'exon muté chez le modèle murin et canin de la maladie par expression de séquence anti sens de l'exon muté dans un petit ARN nucléaire dérivé du snRNA-U7. Cet ARN thérapeutique induit l'exclusion de l'exon muté et la restauration de la phase de lecture abolie par la mutation, c'est ce qu'on appelle le saut d'exon thérapeutique. U7 est exprimé dans le muscle via des vecteurs viraux AAV (AAV-U7) qui sont des vecteurs de thérapie génique dérivés du virus adéno-associé à l'adénovirus. Nos travaux ont également montré que les génomes viraux étaient perdus

progressivement des muscles dystrophiques et que malheureusement une injection d'AAV-U7 thérapeutique induit une réponse immune qui bloque toute réitération. Alors que les essais cliniques utilisant le saut d'exon thérapeutique AAV-U7 pour les patients DMD sont programmés pour fin 2014, il apparaît crucial d'étudier les conditions optimales d'efficacité de l'approche thérapeutique AAV-U7.

Le premier but du projet est de caractériser la perte des génomes AAV des muscles dystrophiques.

Nous proposons de décrire le destin des génomes AAV dans des muscles dystrophiques après injections AAV-U7 dans le modèle de souris mdx déficientes pour la dystrophine comparé aux souris sauvages. Une première étude a montré que les génomes thérapeutiques AAV sont perdus des muscles mdx. Nous continuerons ce travail en caractérisant la perte des génomes AAV pendant la croissance et le vieillissement musculaires.

Le deuxième but est de trouver des solutions pour empêcher la perte des génomes AAV des muscles dystrophiques. Nous étudierons le rôle protecteur de certaines approches pharmacologiques pour optimiser le maintien des génomes AAV-U7 dans les muscles mdx. Le but final est de maintenir l'effet durable du traitement AAV-U7 en stabilisant les fibres traitées.

281- De nombreuses études chez l'homme comme chez l'animal ont montré qu'un individu soumis à un stress psychologique va présenter à la fois des troubles psychopathologiques, en particulier des symptômes d'anxiété et de dépression, et des réponses immunitaires modifiées. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont responsables de ce phénomène n'ont été que partiellement caractérisés. De plus, alors que des situations de stress négatifs ont été largement utilisées pour étudier les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire chez l'animal, pratiquement rien n'est connu sur l'impact de stress positifs, par exemple ceux auxquels sont soumis des animaux lorsqu'ils sont hébergés dans un environnement enrichi (EE) dans lequel ils bénéficient de stimulations sensorielles, motrices, sociales et cognitives.

Le but de notre programme de recherche pour les 5 ans à venir est d'étudier le rôle d'un stress positif -l'hébergement en EE- sur la réponse immunitaire et plus particulièrement dans ce projet sur la réponse anti-tumorale.

Les répercussions des modifications de l'environnement, des modes de vie et des habitudes alimentaires sur l'homme et plus particulièrement sur l'augmentation constatée de l'incidence de certains cancers, constituent à la fois une préoccupation majeure de santé publique et un enjeu important pour la recherche scientifique. En France, l'incidence des cancers a progressé de 48 % chez l'homme et de 46 % chez la femme entre 1980 et 2005. Si la plus grande partie de cette augmentation s'explique par le développement des pratiques de dépistage, cette augmentation est également la conséquence d'une évolution du risque de cancer sans qu'il soit possible en l'état actuel des connaissances d'estimer avec précision la part de l'augmentation liée aux expositions environnementales. Au sens large, l'environnement désigne non seulement les agents physiques, chimiques ou biologiques auxquels un individu est exposé dans son existence personnelle et professionnelle, mais également les situations sociales et les événements tels qu'ils sont perçus par le cerveau. De fait plusieurs études épidémiologiques ont montré que le stress psychologique, le sentiment d'isolement et le manque de soutien de la part des proches constituaient des facteurs de risque importants dans la progression des cancers. De même, de nombreuses études expérimentales chez la souris ont montré que l'exposition à un stress chronique favorisait la croissance tumorale chez l'animal. Inversement, une étude récente et spectaculaire a montré que la croissance tumorale était fortement diminuée lorsque des souris étaient hébergées dans un environnement enrichi dans lequel elles bénéficiaient de stimulations motrices, cognitives et sociales plus importantes que des souris maintenues dans un environnement standard. Des résultats similaires ont été obtenus dans deux modèles de tumeurs transplantées (B16, MC38) ainsi que dans un modèle de polypose adénomateuse se développant spontanément. Les auteurs de cette étude ont montré que l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien jouait un rôle déterminant, notamment via une diminution de la production de leptine par les cellules du tissu adipeux. Malheureusement, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués n'ont été que très partiellement élucidés. Ainsi, il reste à déterminer si la diminution de la quantité de leptine observée chez les souris EE a des répercussions directes sur les cellules tumorales (par exemple en ralentissant leur prolifération) ou indirectes (par exemple en stimulant les cellules de immunité ou en modifiant le microenvironnement tumoral). De même, le rôle d'autres métabolites dont l'abondance est modifiée en EE n'a pas été étudié. C'est notamment le cas de l'adiponectine, une cytokine dont l'expression est augmentée chez les souris EE par rapport aux souris SE et qui a été

démontrée exercer un effet inhibiteur sur la croissance tumorale. C'est également le cas de la corticostérone, un glucocorticoïde dont la quantité est augmentée dans les souris EE mais aussi des récepteurs bêta-2 adrénergiques dont l'expression est augmentée dans le tissu adipeux blanc de la souris.

Notre projet pour les cinq ans à venir est de mesurer l'impact d'un stress positif sur la réponse immunitaire anti-tumorale en utilisant comme modèle, des animaux hébergés dans un environnement enrichi (EE) et injectés par voie intraveineuse avec des cellules tumorales. En effet, si les conséquences de stress positifs sur le développement du système nerveux et sur le maintien des fonctions cognitives ont été largement documentées, très peu de choses sont connues sur l'effet de ce type de stress sur les réponses immunitaires en général et sur les réponses antitumorales en particulier. Comme notre objectif est de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu, nous utiliserons plusieurs lignées de souris KG, déficientes pour diverses molécules impliquées dans les voies de transmission de messages via le système nerveux sympathique (SNS) ou le système HPA (hypothalamus, glande pituitaire, glandes surrénales). Le nombre de souris prévus dans le cadre de ce projet (3720 animaux) peut apparaître élevé au départ mais sera de toute façon revu à la baisse dès les premiers résultats obtenus sur les mécanismes biologiques impliqués.

282- De nombreuses études chez l'homme comme chez l'animal ont montré qu'un individu soumis à un stress psychologique va présenter à la fois des troubles psychopathologiques, en particulier des symptômes d'anxiété et de dépression, et des réponses immunitaires modifiées. Toutefois, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont responsables de ce phénomène n'ont été que partiellement caractérisés. De plus, alors que des situations de stress négatifs ont été largement utilisées pour étudier les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire chez l'animal, pratiquement rien n'est connu sur l'impact de stress positifs, par exemple ceux auxquels sont soumis des animaux lorsqu'ils sont hébergés dans un environnement enrichi (EE) dans lequel ils bénéficient de stimulations sensorielles, motrices, sociales et cognitives. Le but de notre programme de recherche pour les 5 ans à venir est d'étudier le rôle d'un stress positif -l'hébergement en EE- sur le fonctionnement du système immunitaire en prenant comme modèle l'immunisation de souris par une protéine en adjuvant. L'immunisation est ici utilisée comme un moyen de mesurer une réponse immunitaire et donc de préciser in vivo quelles sont les cellules et les molécules cibles dans les mécanismes mis en œuvre lorsqu'un individu est soumis à un stress positif.

Ce projet de recherche fondamentale qui a pour but d'analyser les conséquences en termes de mécanismes moléculaires d'un stress positif sur une réponse immunitaire pourrait avoir des retombées en santé publique, simplement déjà par une meilleure prise en compte de l'état psychologique du patient qui est déterminant pour le succès de tout traitement.

Le nombre de souris prévu est de 5374; ce nombre sera certainement revu à la baisse en cours de projet lorsque nous obtiendrons les premiers résultats.

283- L'objectif est d'étudier les cellules de la défense immunitaire présentes dans le sang des ovins et bovins et comparer leur profil d'expression génique avec celles de l'homme et de la souris pour pouvoir transposer les connaissances acquises dans une espèce aux autres. Il s'agit d'un projet impliquant moins de 60 individus par espèce, leur nombre final dépendant des résultats obtenus au fur et à mesure des analyses sur une période de 5 années.

284- La stimulation cérébrale profonde (SCP), utilisée comme thérapie pour les maladies neurologiques, est également efficace pour le traitement de troubles psychiatriques tels la dépression. En effet, des effets bénéfiques de la SCP d'une région cérébrale ont été récemment montrés chez des patients atteints de dépression résistante aux traitements classiques. Ces travaux font l'objet d'une étude clinique française.

Parallèlement à cet essai clinique, nous développons une étude approfondie des effets de la stimulation à long terme dans un modèle animal de dépression résistante. Ces expériences seront conduites chez une souche de rats connue pour présenter un comportement dépressif spontané. Nous prévoyons d'utiliser 400 animaux sur 5 ans. Un tel effectif est nécessaire afin de parer aux inévitables erreurs expérimentales et de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes.

Les effets bénéfiques potentiels de la SCP chez le rat seront étudiés sur plusieurs caractéristiques comportementales et métaboliques de la dépression : déficits de mémorisation, de prise de décision, de motivation, et perturbation de la réponse au stress. Nous réaliserons également des études d'imagerie du cerveau des animaux par TEP (Tomographie par Emission de Positons) pour explorer l'activité fonctionnelle des structures impliquées dans la dépression.

L'ensemble de ces expériences seront réalisées avant et après SCP chez ces animaux qui seront leurs propres contrôles, limitant ainsi l'utilisation d'un trop grand nombre d'animaux.

La SCP implique une intervention chirurgicale sous anesthésie générale pour placer l'électrode de stimulation au niveau de la région cérébrale d'intérêt. Nous contrôlerons les risques de douleur per- et postopératoires par des protocoles anesthésiques et analgésiques adaptés.

285- La mise en œuvre de ce protocole vise la compréhension et l'identification des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués au cours de l'apprentissage, de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez la souris C57BL6/J. Les objectifs principaux de ce projet sont doubles : premièrement, l'utilisation de modèles comportementaux permettant l'étude de la peur conditionnée chez le rongeur vigile et, deuxièmement, l'identification et la manipulation des structures cérébrales et circuits neuronaux permettant l'expression et/ou l'inhibition des réponses comportementales de peur apprises à la suite du conditionnement et de l'extinction de la peur conditionnée.

L'extinction de la peur conditionnée chez le rongeur est un analogue des thérapies d'exposition chez l'être humain souvent utilisées dans le cadre de pathologies anxieuses telle que le syndrome de stress post-traumatique qui se caractérise par la persistance de mémoires traumatiques à la suite du traitement. L'utilisation d'un modèle comportemental chez le rongeur permettant l'étude des structures cérébrales et circuits neuronaux impliqués dans le maintien des réponses traumatiques de peur nous permettra à terme le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies telles que l'anxiété ou le syndrome de stress post-traumatique. Ce projet implique 11 personnes y compris le chef d'équipe et a fait l'objet de financements nationaux et européens.

286- Ce projet vise au développement de nouvelles voies thérapeutiques pour les maladies induisant la cécité par l'œdème et la formation de néovaisseaux (rétinopathie diabétique, DMLA, CRSC...). Il n'existe aucune cure pour ces maladies qui ont des signes cliniques communs.

L'état d'hydratation de la rétine est finement régulé puisque toute accumulation de fluide intra-rétinien induit des modifications de la vision, voire une perte de la vision centrale. L'œdème maculaire, correspondant à une accumulation de fluide au niveau de la macula (zone centrale de la rétine responsable de l'acuité visuelle), constitue la principale cause de perte visuelle au cours de nombreuses pathologies rétiniennes (la rétinopathie diabétique DMLA, CRSC...). Bien que d'origine multifactorielle, l'œdème maculaire résulte toujours d'un déséquilibre entre les entrées et les sorties de fluides intra-rétiniens, généralement dû à une perméabilité accrue de la barrière rétinienne sanguine, régulant les échanges entre la rétine neurosensorielle et la circulation sanguine rétinienne. Ces mécanismes d'échange sont assurés entre autre grâce à l'activité des aquaporines et des canaux Kir ("K inward rectifying"), dont les niveaux d'expression et la localisation sont altérés par les pathologies.

L'injection intraoculaire de fortes doses de glucocorticoïdes s'est avérée être le traitement actuel le plus efficace pour réduire significativement l'épaisseur de la rétine. Cet effet est cependant imparfaitement corrélé à une amélioration fonctionnelle, puisque la répétition des injections conduit à terme à une dégradation de la vision, probablement du fait des effets secondaires incontrôlés (glaucomes et cataractes) et d'une toxicité des doses élevées des glucocorticoïdes sur les cellules rétiniennes. L'effet spectaculaire et rapide sur l'œdème maculaire reste imparfaitement compris.

L'aldostérone est un corticostéroïde endogène appartenant à la famille des minéralocorticoïdes. Son rôle est bien élaboré dans le rein et dans le cœur (antagonistes à l'aldostérone sont utilisés couramment en clinique). Récemment, il a été démontré que l'aldostérone avait un rôle primordial dans la rétine et l'œdème maculaire (injection d'aldostérone induit des œdèmes, qui sont reversés par des antagonistes à son récepteur).

Les anti-VEGF (Bevacizumab et Ranibizumab) sont des molécules ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le traitement de la formation de néovaisseaux lors des cancers. Ils inhibent la formation de néovaisseaux également dans l'œil. Le Ranibizumab a obtenu l'AMM pour le traitement de la rétinopathie diabétique et de la DMLA). Mais le Bevacizumab est couramment prescrit hors AMM dans l'œil. Nous savons que ces molécules inhibent le VEGF, mais leur mécanisme d'action est également imparfaitement compris. De plus ces molécules induisent des effets secondaires importants (hémorragies conjonctivales, augmentation de la pression intraoculaire).

Il existe donc une nécessité de comprendre les mécanismes d'action de ces deux groupes de médicament comme première étape dans le développement de thérapies plus ciblées et avec peu ou pas d'effets secondaires pour ces maladies incurables.

Lors de ce projet, nous travaillerons sur la caractérisation moléculaire des voies cellulaires impliquées dans l'effet anti-œdémateux des corticostéroïdes et des anti-VEGF afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles plus ciblées. Les rats adultes seront traités par injection intraoculaire de molécule active de façon à réprimer ou sur-exprimer l'expression génomique; impliquant les anti-VEGF ou les corticostéroïdes, leurs récepteurs nucléaires, les partenaires protéiques associés ou les gènes cibles identifiés. Nous utiliserons des méthodes de biologie moléculaire afin de déterminer les cibles in vivo.

Sur le point de vue des 3R, cette règle sera respectée de la façon suivante :

Réduire : Les rétines, fond d'yeux, vitrés et sang seront prélevés des mêmes rats afin de réduire le nombre d'animal

Raffiner : L'enrichissement des cages, le suivi des rats pendant 3 h après les anesthésies et 24h après les anesthésies auront lieu.

Remplacer : des études préliminaires in vitro ont montré qu'un tissu entier est nécessaire pour étudier les effets sur l'œdème de la rétine. Les animaux choisis seront les rats Lewis (car la plupart des études des anti-VEGF et corticostéroïdes dans l'œil sont faites sur cette souche). Pour la 2ème partie du projet qui vise à étudier les effets sur rats diabétiques les souches seront les Goto-kakizaki (rats diabétiques de type 2) et leurs contrôles seront les Wistar (non diabétiques de même fond génétique que les Goto-Kakizaki).

Nombre total de rats= 392

287- 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. Il a été mis en évidence que ces anomalies d'expression de l'ADN touchent en particulier un gène (nommé BIN1) intervenant dans la structure des membranes des cellules musculaires. La compréhension de l'expression de ce gène nous permettra 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 la forme altérée du gène (BIN1), responsable de la maladie. La moitié des animaux utilisés recevra au contraire la forme normale du gène, 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 à déjà été réalisée avec succès par notre équipe (Fugier et al. 2011), 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 BIN1 altéré 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 12 animaux. Ainsi, dans ce projet un total de 24 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.

288- La sarcopénie est définie comme la perte de la masse et des fonctions musculaires liée à l'âge. Une moindre capacité anabolique musculaire (gain protéique) et une augmentation des anomalies métaboliques liées à l'âge (insulinorésistance, ...) participent à ce phénomène. Malgré les conséquences importantes sur l'autonomie du sujet âgé, aucune piste thérapeutique n'est envisagée. La vitamine D (VitD) pourrait améliorer les capacités mécano-métaboliques musculaires chez l'individu âgé. En effet, il a été démontré qu'une carence en VitD était toujours associée à une diminution de la masse, de la force et des capacités contractiles musculaires chez la personne jeune ou âgée aboutissant à une réduction des capacités physiques et à une augmentation du risque de chute et de fracture. A l'inverse, une supplémentation en VitD chez le sujet âgé, améliore significativement les paramètres fonctionnels musculaires. Même si une étude humaine a montré que l'expression du récepteur à la VitD (VDR) dans la cellule musculaire diminuait avec l'âge, très peu d'indications existent sur le rôle métabolique et moléculaire de ce micronutriment dans le muscle et l'impact du vieillissement sur celui-ci. L'objectif général du programme dans lequel s'insère ce projet est de rechercher l'effet de la VitD sur les voies participant à la régulation de la masse et des fonctions musculaires et notamment le niveau de synthèse protéique. De plus, nous souhaitons caractériser les effets génomiques (via son récepteur VDR) et non génomiques de la VitD au niveau musculaire en utilisant un nouveau modèle animal (souris KO VDR musculaire inductible). Ce projet permettra d'améliorer nos connaissances concernant l'effet de la VitD sur le métabolisme musculaire ainsi que son intérêt potentiel dans le traitement des pertes de masse et fonction musculaires liées à l'âge. Afin de mettre en évidence les niveaux d'implication de la carence en VitD et/ou de la diminution du VDR musculaire dans la réduction de l'anabolisme protéique musculaire au cours du vieillissement, un modèle de souris invalidé pour le gène codant pour le VDR (KO VDR) uniquement dans le muscle squelettique (pour n'étudier que l'effet propre à ce tissu) nous est nécessaire. Des études précédentes ont montré que le VDR aurait un rôle important dans le développement et la taille de la fibre musculaire. Par conséquent, et étant donné que nous nous intéressons au vieillissement, l'inactivation du gène VDR doit être effective après la phase de croissance de l'animal : elle doit donc être inductible dans le temps. Ce modèle de souris n'existe pas et sera créé au sein de notre animalerie. La création et la caractérisation du modèle nécessitera l'utilisation de 930 animaux et se fera dans le plus strict respect de la règle des 3R. En agissant sur le niveau plasmatique en VitD (carence ou supplémentation dans la nourriture) et sur le niveau d'expression du VDR musculaire, ce modèle devrait nous permettre de déterminer si la VitD et son récepteur ont un rôle dans la réduction de l'anabolisme musculaire au cours du vieillissement.

289- Les populations de blaireaux infectées par *Mycobacterium bovis*, l'agent responsable de la tuberculose bovine (TB), transmissible à l'homme, peuvent maintenir cette bactérie et, dans certaines régions, recontaminer les bovins, menaçant alors les programmes d'éradication de la TB en élevage.

Les mesures sanitaires d'abattage pour contrôler la TB chez les blaireaux sont mal acceptées par le public et leur efficacité à grande échelle est incertaine et controversée.

La vaccination est donc envisagée pour contrôler cette maladie dans les populations de blaireaux et, indirectement, sa transmission aux bovins. En Grande Bretagne, la démonstration de l'efficacité et l'innocuité de la souche *M. bovis* BCG (utilisée chez l'homme) comme vaccin antituberculeux chez le Blaireau a permis l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché du « Badger BCG » depuis mars 2010. Ce vaccin vivant injectable est à présent utilisé de façon ciblée sur le terrain en Angleterre par les vétérinaires, les éleveurs et le gouvernement anglais.

La vaccination orale peut permettre de contrôler une maladie chez les animaux sauvages (exemple de la lutte contre la rage vulpine ou la peste porcine classique chez les sangliers).

Des résultats d'efficacité sur blaireaux anesthésiés, en République d'Irlande comme en Grande-Bretagne, ont montré que le BCG vivant par voie orale pouvait avoir un effet protecteur chez le blaireau.

La mise au point d'appâts vaccinaux utilisant le BCG impose que le BCG survive dans les appâts jusqu'à leur prise par l'espèce cible et que soient limités les conséquences pour l'environnement de la libération en quantité massive d'un vaccin vivant et le coût de production des appâts.

D'autres candidats vaccinaux que le BCG sont envisageables. Des travaux récents en Espagne ont notamment démontré l'efficacité vaccinale de *M. bovis* inactivé (par la chaleur) chez le sanglier. Reste posée la question de l'efficacité chez les blaireaux de ce vaccin inactivé qui permettrait d'envisager leur vaccination à un faible coût (comparé à celui du BCG) et sans risque pour l'environnement.

Le projet de 5 ans présenté ici vise à contribuer au développement du vaccin oral contre la tuberculose du blaireau. Il prévoit prioritairement de répondre à la question concernant l'efficacité vaccinale de *M. bovis* inactivé, à raison d'une étude tous les 2 ans et l'utilisation de 100 blaireaux au maximum. Il a pour objectif de vérifier expérimentalement :

- L'efficacité du vaccin candidat,
- La dose minimale vaccinante,
- La composition et la dose du "diluant",
- L'efficacité du vaccin distribué en appât.

Chaque étape nécessitera un contrôle de la protection avec inoculation expérimentale (épreuve vaccinale).

Les résultats de cette étude seront également importants si le vaccin n'est pas protecteur car ils orienteront le choix des études suivantes du projet concernant le BCG, qui viseront alors le développement de méthodes permettant de maximiser l'entrée du BCG vivant telles que l'utilisation de composés muco adhésifs ou/et entéro-protecteurs non-encore étudiés chez le blaireau. Les résultats permettront de cibler une délivrance du vaccin permettant d'obtenir une protection maximale et donc d'optimiser la constitution des appâts.

290- L'ensemble de ces recherches vise à mieux connaître et remédier aux détériorations dégénératives cochléaires liées à la perte des cellules sensorielles et nerveuses de la cochlée, causes principales de la surdité neurosensorielle chez l'homme. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la surdité est définie par la perte complète ou partielle de la capacité auditive d'une ou des deux oreilles. L'altération peut être légère, modérée, sévère ou profonde. Classiquement, les atteintes sont de deux types : surdité de transmission et surdité de perception (ou neurosensorielle). Les surdités de transmission sont liées à une affection de l'oreille externe ou moyenne. Ce type de pathologie otologique est souvent curable médicalement ou chirurgicalement. Les surdités neurosensorielles quant à elles sont en général liées à une atteinte de l'oreille interne et parfois du nerf auditif. Ce type d'altération de l'audition est souvent irréversible. Actuellement, en l'absence de traitement curatif, la surdité neurosensorielle nécessite une rééducation, moyennant une prothèse auditive. La surdité neurosensorielle peut être profonde, bilatérale, et avoir de graves répercussions sur l'intégration sociale, l'éducation, l'accès à une profession, à la santé et l'espérance de vie du patient.

Les expérimentations animales planifient d'évaluer la greffe de plusieurs types de cellules souches/progénitrices humaines dans des modèles animaux de surdité.

Nos travaux combinent des approches cellulaires, pharmacologiques électrophysiologiques, et histologiques afin de suivre les processus de la dégénérescence des structures neurosensorielle de l'oreille interne, et les possibilités de régénération cellulaire et restauration auditives à la suite de la greffe cellulaire.

Les animaux utilisés sont des rongeurs (cobayes, souris) pour lesquels des données scientifiques du système auditif sont bien établies. Le nombre d'animaux prévu est d'une cinquantaine par an pour les cobayes et une cinquantaine par an pour les souris. Comme chez l'homme on observe chez l'animal une grande variabilité individuelle de vulnérabilité aux conditions nocives produisant des pathologies auditives. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés des expériences préliminaires sont réalisées sur un nombre restreint d'animaux puis selon les résultats le nombre d'animaux d'étude sera éventuellement augmenté si un effet semble exister mais n'est pas suffisamment manifeste. Une partie importante des études fonctionnelles en électrophysiologie sera faite en études chroniques employant les mêmes animaux ce qui permet à la fois de réduire le nombre d'animaux et de supprimer partiellement la variabilité individuelle puisque chaque animal est son propre contrôle.

291- Ces études concernent différentes étapes de la transition entre un cerveau sain et épileptique. Elles sont impossibles chez l'homme puisque le diagnostic d'épilepsie est porté quand la maladie est constituée. Seuls les modèles animaux permettent d'étudier les modifications cérébrales conduisant à l'émergence de la maladie. Ainsi, l'injection d'une petite dose d'un convulsivant dans une région corticale de souris nous permettra d'explorer trois phases retrouvées chez l'homme: 1) un état de mal produisant la mort neuronale, 2) les processus d'épileptogenèse incluant l'inflammation et la réorganisation neuronale et synaptique et (3) les processus qui déclenchent les crises d'épilepsie partielle.

Nous utiliserons des souris ayant reçu une neurotoxine injectée de façon focale dans une aire du cerveau susceptible de produire les crises d'épilepsie. Nos techniques incluent l'anatomie, l'imagerie non-invasive du cerveau ainsi que l'électrophysiologie sur animaux en mouvement libre et sur tranches de tissu cérébral préparées à partir du cerveau des animaux épileptiques.

Le but de ces études sera une meilleure compréhension des processus de sclérose et d'épileptogenèse ainsi que l'amélioration des thérapies anti-épileptiques et neuroprotectrices.

Ces questions doivent être étudiées avec les modèles animaux d'épilepsie, puisque:

(1) L'ensemble des phénomènes pathologiques peuvent difficilement être étudiés chez l'humain. (2) La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés des crises générées sur cerveau entier incluant les spécificités

du site d'initiation et le patron de propagation. (3) La modélisation par ordinateur nécessite des données originales telles que nous espérons découvrir par les expériences prévues.

Les souris présentent plusieurs avantages pour nos travaux. Elles ont un cerveau assez complexe pouvant générer les activités épileptiques mais sont moins susceptibles de ressentir de la souffrance que les primates par exemple. Puisque le modèle animal d'épilepsie que nous utiliserons a été développé chez la souris, d'abondantes données sont déjà disponibles. Les souris se prêtent aussi à la modification génétique qui facilitera certains de nos travaux. Nous estimons utiliser ~500 animaux en 5 ans. Bien que les animaux ne puissent pas être remplacés dans nos expériences, nous prenons les mesures afin de réduire leur utilisation. Certains de nos travaux seront mieux accomplis en ayant recours à du tissu cérébral humain disponible parfois suivant la chirurgie chez des patients ayant des épilepsies intractables. La culture cellulaire ou organotypique ainsi que la modélisation par ordinateur seront utilisées pour certains aspects de nos travaux. Nous raffinons sans cesse notre hébergement et utilisation des animaux afin de réduire la douleur et améliorer leur vie. Nous sommes convaincus que seuls de tels procédés nous permettront de produire un meilleur modèle des processus biologiques et pathologiques que nous étudions.

292- Notre laboratoire s'intéresse aux circuits neuronaux qui sous-tendent la perception des odeurs. Nous utilisons une combinaison d'approches expérimentales chez la souris, incluant génétique moléculaire, imagerie in vivo, et analyse du comportement, pour comprendre la logique du codage de l'information sensorielle par les différents relais olfactifs du cerveau. La perception des odeurs repose d'une part sur la reconnaissance des divers composants odorifères en périphérie, et d'autre part sur des mécanismes généraux dans le cerveau qui permettent la discrimination des odeurs. Chez les souris, les odeurs sont reconnues par des récepteurs olfactifs exprimés à la surface des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif. Chaque odeur active un sous-ensemble de neurones sensoriels, et est représentée par un pattern d'activité glomérulaire spatialement invariant dans le bulbe olfactif, le premier centre de traitement de l'information olfactive. L'information encodée par l'activité des glomeruli est ensuite transmise par les cellules mitrales et projetée vers divers centres olfactifs de plus haut-niveau, qui pourraient être impliqués dans la production des réponses comportementales à partir des représentations corticales. Des expériences d'imagerie biphotonique in vivo et des analyses comportementales de ces souris nous ont suggéré un modèle du traitement de l'information olfactive selon lequel la reconnaissance de motifs d'activité neuronale au-dessus du bruit de fond (phénomène de contraste), est cruciale pour la détection des odeurs. Pour mettre à l'épreuve ce modèle, nous employons des techniques de pointe d'imagerie in vivo pour comprendre comment le cerveau génère les représentations corticales d'odeurs à partir des patterns d'activité glomérulaire.

Nous utilisons des lignées de souris génétiquement modifiées pour caractériser l'activité neuronale induite par les odeurs dans les différents types de neurones du cortex olfactif. Enfin, nous utilisons des approches optogénétique pour analyser l'organisation fonctionnelle de ces différents circuits neuronaux et leurs rôles dans les réponses comportementales aux odeurs. Le laboratoire utilise une approche interdisciplinaire, combinant génétique moléculaire de la souris, imagerie fonctionnelle in vivo et paradigmes comportementaux pour étudier ces questions clés de biologie sensorielle et neurosciences. Ce processus sensoriel ne peut être étudié que dans un animal en vie, et ne peut être reproduit en culture cellulaire.

Nous utiliserons trois souris par semaine, sur 5 ans :

Nombre total d'animaux pour le protocole d'optogénétique sur 5 ans : 830 souris

Nombre total d'animaux pour le protocole d'imagerie in vivo sur 5 ans : 830 souris

Donc un total de 1.660 souris.

293- Plusieurs résultats récents indiquent que la protéine Dyrk1a, une sérine thréonine kinase est un excellent candidat pour tenter de modifier les altérations cognitives des patients porteurs de trisomie 21 : i/ l'analyse de patients porteurs de trisomie 21 partielle a permis de définir des régions critiques dont la duplication est impliquée dans l'apparition de phénotypes de la trisomie 21. Parmi ces régions la DCR-1 est associée à plusieurs signes phénotypiques incluant le retard mental: cette région contient 20 gènes dont dyrk1a; ii/ ce gène est impliqué à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire et dans celui de la plasticité synaptique; iii/ il est surexprimé chez les porteurs de trisomie; iv/ l'étude des modèles murins montre son importance dans les mécanismes de la cognition. Dans une étude précédente nous avons établi qu'un inhibiteur de Dyrk1a, l'EGCG, présent dans des extraits de thé vert permet de corriger plusieurs altérations cognitives. Deux modèles différents seront utilisés pour étudier l'effet d'inhibiteurs de DYRK1a: un modèle de surexpression limité au gène Dyrk1a et le second le remplaçant dans un contexte de trisomie de 90 gènes. Nous souhaitons répondre à deux questions : 1- est-il possible de traiter des animaux in utero et d'arrêter le traitement au sevrage après les principales étapes du développement cérébral en conservant les effets à l'âge adulte (procédure 1 et 2 : 3x20 animaux mâles, 3x12 animaux femelles); 2- un inhibiteur de synthèse (conçu au cours de l'ANR DSTHER) peut-il produire des effets comparables à ceux de l'EGCG (procédures 3 et 4 : 2x40 animaux mâles, 2x24 animaux femelles). La possibilité d'agir pendant le développement cérébral des patients serait un pas important dans l'amélioration de leur qualité de vie.

294- Malgré toutes les avancées du diagnostic et de la prise en charge du cancer, 90% des patients atteints de cancer meurent à cause de leurs métastases. La possibilité de développer un traitement ou de guérir un malade métastatique est relativement modeste. Ceci est dû en grande partie à la complexité des mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu lors du processus métastatique. Afin de permettre une meilleure compréhension de ces mécanismes, et donc d'identifier les principaux acteurs de la progression et de la rechute métastatique et de les cibler, nous proposons la mise en œuvre au laboratoire d'un modèle orthotopique, c'est à dire situé au niveau de son tissu d'origine, de cancer du sein : le modèle 4T1. Ce modèle est largement

décrit dans la littérature comme étant fortement métastatique. Il permet de mimer la pathologie humaine, dans lequel le système immunitaire est intact, les interactions tumeur-stroma (tissu en grande partie conjonctif) sont conservées et des métastases apparaissent au niveau de différents organes de la souris : poumons, foie, rate et ganglions. Ce modèle sera utilisé pour tester l'efficacité de molécules modulant l'angiogenèse, le système immunitaire et/ou le pouvoir invasif et/ou prolifératif des cellules tumorales. Les molécules auront été préalablement sélectionnées à partir de modèles expérimentaux réalisés sur des cellules en culture ou qui ont démontré une activité dans d'autres types de cancer, chez la souris ou chez l'homme. En l'absence de méthodes de substitution ce projet sera effectué sur des souris, considérant la forte homologie biologique avec l'humain, et la facilité de leur manipulation. En se basant sur les données de la littérature concernant ce modèle orthotopique de cancer du sein et en conformité avec la règle des 3R, une première expérience d'optimisation sera réalisée pour la mise au point du modèle et permettre de réaliser un calcul d'effectif afin de réduire le nombre de souris nécessaire par groupe. Une estimation totale de 450 souris est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

295- Ce projet de recherche fondamentale concerne l'étude des fonctions cérébrales médiées par une molécule abondante dans le cerveau, la somatostatine et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Puisque les taux de somatostatine diminuent dans certaines pathologies humaines comme la maladie d'Alzheimer (MA) et la dépression, nous étudions aussi les mécanismes de cette vulnérabilité dans l'espoir de pouvoir utiliser la somatostatine comme biomarqueur du développement de ces pathologies. En effet nous avons récemment montré chez le rongeur l'implication de la somatostatine dans le contrôle de certaines fonctions qui sont spécifiquement altérées au cours du vieillissement normal et pathologique chez l'Homme, comme l'olfaction, la mémoire, les émotions. Nous recherchons donc si l'altération des systèmes somatostatinerigiques est en relation avec ces déficits comportementaux et physiologiques. Nos travaux de recherche sont menés par des approches interdisciplinaires et intégrées (cellulaires, moléculaires, endocriniennes, génétiques, physiologiques et comportementales) utilisant des procédures d'expérimentation sur l'animal de gravité légère à modérée. Ce projet sera mené en conformité avec la réglementation éthique en vigueur en garantissant la règle des 3R. En effet seule l'utilisation de souris peut permettre d'évaluer la plasticité des systèmes somatostatinerigiques cérébraux et les réponses adaptatives lors du vieillissement normal ou expérimental de l'organisme entier en reproduisant certains paramètres de la pathologie comme l'expression de marqueurs physiopathologiques ou de déficits comportementaux avérés (olfactifs, cognitifs ou émotionnels). Le nombre d'animaux utilisés dans ces procédures sera réduit au minimum nécessaire pour l'exploitation correcte des résultats obtenus (réduction) et les conditions expérimentales optimisées pour garantir le bien-être des animaux et limiter toute douleur occasionnée (raffinement). Sur ces principes le nombre maximal d'animaux nécessaires pour réaliser ce projet est estimé à 2302 souris sur cinq ans pour réaliser l'ensemble des protocoles expérimentaux détaillés ci-dessous.

296- Le but de cette étude est de mieux comprendre à l'aide d'un modèle animal environnemental les anomalies développementales qui sous-tendent les phénotypes autistiques, et d'essayer de trouver de nouveaux biomarqueurs pour développer de nouveaux outils diagnostiques.

Pour cela, nous utiliserons un modèle de troubles autistiques bien caractérisé consistant en une exposition prénatale au valproate chez le rat. Les femelles gestantes recevront une injection i.p. de cette substance au 9ème jour de gestation puis différents paramètres seront étudiés chez la progéniture mâle tels que le métabolisme cérébral, la neuroinflammation et la neurotransmission glutamatergique en utilisant différentes méthodes in vivo (imagerie scintigraphique) et in vitro (immunohistochimiques, transcriptomiques, métabolomiques).

Cette étude sera réalisée sur un total de 120 animaux incluant 2 fois 10 rats femelles gestantes (10 VPA, 10 Sham) et 100 rats mâles issus de leurs portées.

Éléments de remplacement, réduction et raffinement mis en œuvre :

- L'enrichissement dans les cages d'hébergement sera systématique (Sizzle Nest).
- A tout stade de l'étude, si les animaux présentent des critères de dépassement du point limite, ils seront euthanasiés par injection de pentobarbital dans la veine caudale.
- Les rates gestantes seront surveillées toutes les 30 min pendant 2h après injection du valproate.
- Dans ce type d'étude, l'unité pour chaque mesure expérimentale est la portée, donc les petits d'une même portée seront dédiés à des protocoles différents (n=10 mâles par mesure expérimentale).
- L'utilisation de l'imagerie scintigraphique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car permet la réalisation d'études longitudinales et chaque animal est son propre contrôle.
- Des études préliminaires indiquent que des effectifs de n=10 par groupe sont nécessaires pour dégager des effets significatifs au seuil de  $p < 0,01$  compte tenu de la variabilité inter-individuelle des animaux et de l'expérience. Les cerveaux des animaux passés en imagerie seront ensuite utilisés pour des analyses d'immunohistochimie.

297- La prééclampsie (8% des grossesses) est une maladie potentiellement létale chez la mère et l'enfant, s'accompagnant d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) dans 1/3 des cas. Elle est liée en partie à une insuffisance placentaire par défaut de vascularisation placentaire, mais l'origine de la maladie est par ailleurs multifactorielle.

L'étude placentaire en imagerie est actuellement l'apanage de l'échographie avec étude doppler. Cependant il ne s'agit que d'une méthode indirecte ne permettant pas la quantification de paramètres microcirculatoires placentaires. L'IRM prend une place croissante dans la pathologie obstétricale et le diagnostic anténatal. La fonction placentaire est de plus en plus étudiée grâce à plusieurs modalités d'imagerie (élastographie, ASL, diffusion, IRM dynamique après injection de gadolinium ou produits

superparamagnétiques). Parmi elles, la DCE IRM (IRM dynamique) après injection de gadolinium est une méthode robuste ayant permis le calcul de paramètres de perfusion (F) et de perméabilité placentaire (PS), chez le rat et la souris dans plusieurs publications. L'objectif est d'étudier la perfusion placentaire à l'aide d'une technique éprouvée chez un modèle animal de prééclampsie et retard de croissance se rapprochant au mieux de la pathologie humaine. Ce travail sera réalisé sur le modèle d'inhibition chronique de synthèse de l'oxyde nitrique NO par le LNAME (L nitro arginine méthyl ester) chez la rate par DCE IRM après injection de chélates de gadolinium, sur une IRM à haut champ (4,7 T) dédiée petit animal. Il s'agira d'induire les symptômes de prééclampsie et RCIU en délivrant de façon continue la solution de LNAME, ce que nous avons choisi de réaliser par l'implant de mini-pompes sous-cutanées (sous anesthésie générale). Cette méthode permet d'éviter une injection sous-cutanée journalière aux animaux et permet un meilleur contrôle de la quantité de LNAME que l'ingestion per os dans l'eau de boisson. Le LNAME sera remplacé par du sérum physiologique pour le groupe témoin, pour lequel nous devons reproduire les mêmes procédures (implant de mini-pompes) afin de s'affranchir de l'effet potentiellement stressant (et altérant les résultats) de cette procédure. L'IRM sera réalisée sous anesthésie générale avec injection de gadolinium. Après l'IRM, la rate sera ensuite sacrifiée puis une césarienne effectuée pour une analyse morphométrique des unités fœtoplacentaires, indispensable pour valider le modèle (i.e. l'apparition d'un RCIU dans le groupe LNAME). La rate a été préférée à la souris pour une question de taille, la rate offrant une possibilité d'analyse plus fine des unités fœtoplacentaires que les souris. Nous avons choisi les rates Sprague-Dawley car elles ont déjà été utilisées avec succès dans ce modèle LNAME. Les données IRM seront analysées grâce un logiciel permettant le calcul de la fraction volumique sanguine et la perfusion à partir d'une modélisation mathématique. Le nombre d'au moins 30 animaux est nécessaire pour mettre en évidence une différence statistique entre le groupe d'étude et le groupe témoin d'au moins 20%, avec une puissance nécessaire, et a été établi grâce à un calcul statistique basé sur les données de la littérature.

Nous espérons ainsi permettre une meilleure connaissance cette pathologie qu'est la prééclampsie.

298- Le GnRH ou gonadolibérine est une hormone décapeptide synthétisée par l'hypothalamus. Il stimule la synthèse et la sécrétion des hormones gonadotropes hypophysaires LH et FSH.

En médecine vétérinaire, le GnRH ou ses analogues sont utilisés:

- pour traiter les kystes folliculaires,
- au moment de l'insémination artificielle pour induire l'ovulation,
- en milieu de cycle pour maîtriser la vague de croissance folliculaire,
- en association avec la prostaglandine F2 alpha, pour synchroniser les chaleurs et réaliser une insémination à un moment prédéterminé.

En France, les molécules utilisées chez les ruminants sont la gonadolibérine, la buséreline et la léciréline. La modification de groupements chimiques à partir du décapeptide naturel conduit à la synthèse d'analogues (buséreline, léciréline) plus puissants que la gonadolibérine naturelle, c'est-à-dire que la dose nécessaire pour obtenir un effet est généralement inférieure à celle de la molécule naturelle. Ces différences de puissance entre les spécialités sont parfois mal comprises par les vétérinaires praticiens qui s'interrogent sur d'éventuelles différences d'efficacité des spécialités.

L'objectif de cette étude est de comparer les effets d'une GnRH la gonadolibérine et de deux agonistes, la buséreline et la léciréline sur la sécrétion de LH et sur le follicule dominant. Ces spécialités seront utilisées à la dose thérapeutique pour induire l'ovulation.

L'étude sera réalisée sur 12 génisses Prim'Holstein (dont 3 satellites), âgées de 12 à 15 mois et dont le cycle aura été préalablement contrôlé avec des progestagènes ou des prostaglandines F2alpha. Les génisses seront assignées au hasard dans 3 groupes. Chaque génisse recevra les trois traitements gonadoreline, léciréline ou buséreline au cours de 3 périodes séparées de 17-20 jours, selon un plan en carré latin.

Le critère clinique principal est la sécrétion de LH en réponse à la gonadoreline, la léciréline et la buséreline. Pour standardiser le statut physiologique des femelles, cette réponse sera évaluée en phase lutéale, au septième jour du cycle.

Le deuxième critère clinique évalué dans notre étude est le devenir du follicule dominant vers la lutéinisation ou l'ovulation en réponse à la GnRH. Un suivi échographique de la vague folliculaire sera réalisé quotidiennement du jour précédant l'administration de GnRH jusqu'à 4 jours après l'administration. Les concentrations plasmatiques de progestérone seront également suivies quotidiennement, avant le traitement avec la GnRH ou l'analogue et jusqu'à 4 jours après l'administration. Pour évaluer si la lutéinisation du follicule dominant induite par la gonadolibérine est associée à une augmentation des concentrations de progestérone.

299- La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui, en raison du vieillissement croissant de la population, est devenue un réel problème de santé publique. Les recherches thérapeutiques jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier une cible pertinente. Tout au plus les traitements prescrits permettent de modérer les symptômes mais en aucun cas de stopper durablement l'évolution des lésions cérébrales et le déclin cognitif des patients.

Les échecs thérapeutiques récents pourraient d'expliquer par la connaissance, encore très partielle, des mécanismes physiopathologiques de la MA. Un rôle central d'une petite protéine, le peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) a été découvert il y a déjà 30 ans. Ce peptide précipite au cœur des plaques séniles qui constituent une lésion caractéristique dans le cerveau des patients. Pourtant la densité des plaques séniles n'est que faiblement corrélée aux facultés intellectuelles et les dépôts d' $A\beta$  peuvent même être observés chez les sujets âgés au cours du vieillissement « normal ». Par ailleurs, des études récentes



d'immunothérapie chez l'homme ont montré que l'élimination des plaques par vaccination anti-A $\beta$  ne s'accompagnait pas d'une amélioration des symptômes.

Certaines espèces (solubles) ou localisations (hors des plaques) du peptide A $\beta$ , récemment découvertes, pourraient, elles, avoir un lien plus direct avec la pathologie. On sait en effet que ces formes particulières du peptide sont toxiques, en perturbant notamment la communication entre les neurones, au niveau des synapses. L'accumulation du peptide A $\beta$ , directement dans les neurones, peut, elle, entraîner la mort des cellules. Ces observations dérivent principalement d'études in vitro, c'est-à-dire réalisées dans des modèles « artificiels » de cultures de neurones. Il est crucial de valider in vivo, dans des modèles animaux de MA, la pertinence de ces observations : est-ce que le peptide A $\beta$  est réellement toxique, et peut-il engendrer les signes cliniques de la MA, lorsqu'il est présent dans le cerveau sous forme soluble et diffusible ou bien encore lorsqu'il précipite dans les neurones ?

Pour répondre à ces questions nous utilisons différents modèles de souris. 1) des souris génétiquement modifiées qui vont développer des plaques mais également une accumulation intraneuronale de peptide A $\beta$ . 2) des souris « normales » qui reçoivent une injection intracérébrale de peptide A $\beta$  sous forme soluble. Ces deux modèles permettent de tester nos hypothèses de travail. Les travaux réalisés sur ces modèles viseront à mettre en évidence les déficits « intellectuels » (troubles de mémoire et d'apprentissage) en évaluant les souris dans différents tests comportementaux. Afin de mesurer le fonctionnement cérébral des souris, nous utiliserons des techniques d'imagerie par IRM. A la fin des études les souris seront euthanasiées et leur cerveau analysé au microscope afin de quantifier l'étendue des lésions (présence de plaques, analyse des jonctions synaptiques entre les neurones, quantification de la perte des cellules, détection de l'inflammation etc.).

Ce projet a déjà été initié il y a quelques années avec des résultats prometteurs : les deux modèles de souris présentent des troubles de mémoire (qui évoluent avec l'âge). Pour démontrer de façon précise et documentée la relation qui existe entre ces troubles comportementaux et la présence du peptide A $\beta$  dans le cerveau, plusieurs années de travail sont encore nécessaires. Chaque année environ 160 125 souris seront utilisées (nombre total d'animaux utilisés sur la durée du projet, n=625). Chaque expérience regroupera de 10 à 20 souris (un effectif suffisant pour mener à bien des études comportementales et l'obtention de résultats robustes et reproductibles). Les procédures réalisées chez l'animal seront non-invasives et peu traumatisantes (eg tests comportementaux) ou contrôlées dans le cas de chirurgies courtes (anesthésie et analgésie). L'ensemble des données collectées au cours des 5 prochaines années permettra de préciser de façon fine quel est le rôle du peptide A $\beta$  dans la MA, ouvrant ainsi la porte à de nouvelles avancées thérapeutiques.

300- Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier la pharmacocinétique ou la pharmacodynamie de produits vétérinaires chez le chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit: pour chaque formulation, 3 à 9 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant. Pour augmenter la puissance statistique des résultats et limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des présentations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées. La pharmacocinétique ou la pharmacodynamie reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou sur la récolte des fèces et/ou sur des prélèvements d'urine (fréquence et volume des prélèvements déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, selon recommandations bibliographiques).

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 270 chiens, ce nombre pouvant être diminué par la réutilisation des animaux.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.