



**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 (10)

1001- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées. L'une des thématiques de notre équipe est la réalisation de criblages génétiques sur modèles cellulaires afin d'identifier des gènes impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de la DMLA. Ce projet a pour but d'étudier certaines de ces hypothèses ainsi que de valider in vivo les effets des gènes identifiés in vitro, en régulant leur expression (surexpression ou inhibition) de manière ciblée dans l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez la souris. Ces études devraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la DMLA et de développer de nouveaux traitements pour l'homme.

Un total de 409 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences. Après les premières expériences d'injection, nous tenterons de réduire au maximum le nombre de souris utilisées par groupe en fonction de la reproductibilité de ces expériences. Nous espérons rapidement pouvoir réduire les quantités de souris de 10 à 20 % par groupe. Une surveillance sera réalisée par le manipulateur pendant la durée de la chirurgie, lors du réveil et le lendemain matin. Les souris seront ensuite observées quotidiennement par l'animalier et/ou le manipulateur. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés entre le jour de la manipulation et la fin du protocole. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

1002- Il a récemment été suggéré qu'au niveau du cerveau, les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière séparant le sang, compartiment où s'accumulent des agonistes microbiens, pro-inflammatoires voire contre-inflammatoires, seraient l'un des dommages essentiels initiant ces troubles et dommages cérébraux. Brièvement, également nommée unité neuro-vasculaire, la barrière hémato-encéphalique est une entité complexe à laquelle contribuent i) outre les cellules de la paroi endothéliale qui repose sur une lame basale, ii) les astrocytes et iii) les cellules microgliales, autant de cellules qui assurent la protection du réseau de neurones et d'oligodendrocytes du système nerveux avec lequel elles communiquent.

Dans ce projet, nos objectifs sont:

1. de caractériser le contenu explicatif de l'expression « activation microgliale » un processus complexe qui initierait la neuro-inflammation au cours des processus infectieux systémiques non contrôlés : pour ce faire va être validée la pertinence biologique d'un modèle expérimental de choc septique qui repose sur le recours à des souris transgéniques,
2. d'explicitier des signatures de mécanismes moléculaires et cellulaires de communication intercellulaire au sein du Système Nerveux Central (SNC), en particulier entre cellules microgliales et astrocytes
3. d'explicitier et de caractériser des mécanismes impliqués dans les altérations de la barrière hémato-encéphalique.
4. d'évaluer l'impact des gaz inertes, des statines et de l'hémisuccinate d'hydrocortisone sur des cellules microgliales activées de cerveaux murins en culture puis sur l'inflammation centrale et périphérique ainsi que sur la neuro-protection, dans le contexte des modèles murins.
5. d'analyser et de caractériser des altérations des nerfs périphériques.

Ces différents axes de recherche seront explorés chez 420 souris de laboratoire et partiellement reconstruits avec des modèles de culture cellulaire. Ceci nous permettra, à terme, de développer un essai préclinique et in fine de proposer une stratégie neuro-protectrice pour l'homme.

Dans le cadre de ce projet, notre Unité s'est associée à plusieurs équipes explorant soit le Système Nerveux Central (SNC) soit le Système Nerveux Périphérique (SNP). Nous aurons recours à des modèles murins transgéniques ou non et en particulier à des souris C57BL/6, à des souris génétiquement modifiées permettant :

- d'observer par imagerie les cellules non neuronales du SNC (CX3CR1GFP/+, les cellules microgliales spontanément fluorescentes, des astrocytes {(GLT1)/EGFP BAC reporter transporter, GFAP/GFP, ADLH-L1/GFP}
- d'explorer des signatures fonctionnelles dépendantes des connexines (souris Connexine 30-/- et 43-/-).
Ce projet a été élaboré dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux en valorisant chaque sacrifice de souris. Le calcul du nombre d'animaux nécessaire a été effectué à l'aide de nos données préliminaires. En outre, pour éviter tout processus douloureux ou d'inconfort nous aurons recours à une anesthésie générale ou à des molécules antalgiques, Par ailleurs dans le souci de réduire le nombre d'animaux, les premières étapes de sélection de molécules seront réalisées par des études in vitro.

1003- Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses, aux fractures, aux reprises prothétiques et aux tumeurs sont fréquents et concernent de nombreuses interventions en orthopédie. Les défauts osseux de taille critique se définissent comme des pertes de substances qui ne se répareront pas et qui requièrent alors la mise en place d'une greffe osseuse. Une alternative thérapeutique à l'autogreffe se développant actuellement est l'ingénierie tissulaire osseuse qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules ostéo-progénitrices (telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM)). L'efficacité thérapeutique de cette approche a été démontrée in vivo dans des modèles précliniques mais les résultats restent toujours inférieurs à ceux de l'autogreffe osseuse. Pour ces raisons, des études visant à optimiser ces matériaux cellularisés sont nécessaires.

Le type de matériau utilisé et sa forme architecturale sont reconnus comme être des paramètres clés au succès de l'efficacité thérapeutique des matériaux cellularisés. Nous avons récemment prouvé dans un modèle d'implantation en site ectopique chez la souris que le potentiel ostéogène du matériau cellularisé dépendait, entre autre, de la taille des particules du matériau. La formation osseuse est non seulement optimale mais aussi associée à la formation d'une cavité médullaire dans les implants, la moelle osseuse étant un réservoir naturel des CSM et des cellules souches hématopoïétiques.

Dans ce projet, nous souhaitons valider l'intérêt d'utiliser ce type de matériau associé à des CSM humaines en site orthotopique, dans un modèle de grand défaut osseux chez la souris. Notre hypothèse étant que cette formulation de matériau cellularisé augmente l'ostéogénèse via un accroissement de la vascularisation. Pour tester cette hypothèse, nous évaluerons les paramètres suivants :

- La formation osseuse (in vivo et ex vivo)
- La vascularisation de l'implant (ex vivo)

Enfin, afin de mieux comprendre la relation formation osseuse – CSM implantées, nous évaluerons en plus :

- La survie des CSMs après l'implantation (in vivo et ex vivo)

Modèle expérimental : souris immunodéficientes Nude males, âgées de 10 semaines. Une ostéotomie de taille critique se fera au niveau du fémur. Le défaut osseux sera comblé par le biomatériau biohybride (avec cellules) ou le biomatériau sans cellules (groupe de contrôle).

9 souris seront affectées par groupe: groupe contrôle (dont l'implant correspond au matériau seul), groupe matériau cellularisé, soit un total de 18 souris

En raison de l'utilisation d'appareillages d'imagerie non-invasive pour petits animaux, le suivi de la formation osseuse (par micro-scanner in vivo) et de la survie des cellules (bio-imageur bioluminescence) implantées au cours du temps se fera sur les mêmes animaux.

La souffrance sera limitée par analgésie pré- et post-opératoire (buprénorphine) toutes les 12 heures pendant les 3 premiers jours.

Pour chaque analyse (micro-scanner ou bio-imageur) , les souris seront anesthésiées par isoflurane.

1004- Le cancer du foie est la 3^{ème} cause de mort par cancer dans le monde et constitue donc un problème de santé publique important. Une cellule normale devient cancéreuse à la suite d'accumulation d'erreurs génétiques et épigénétiques qui altèrent l'expression de gènes essentiels aux fonctions normales de la cellule. Bien que des avancées majeures aient été faites dans ce domaine, de nombreuses questions restent encore sans réponse, en particulier i) comment la structure de la chromatine influence t-elle l'expression des gènes, H) comment cette structure est elle établie et maintenue au loci et aux temps appropriés et enfin, iii) comment l'organisation de la chromatine influence-t-elle l'identité cellulaire et par conséquent comment est-elle impliquée dans le développement de cancer. Le projet que nous proposons est de répondre à ces /\ questions à travers l'analyse de modèles animaux que nous avons établit au laboratoire dans lesquels nous avons muté des protéines chromatiniennes particulières conduisant à la formation spontanée de tumeurs spécifiquement dans le foie.

1005- Le projet concerne l'étude du rôle des interneurons cholinergiques striataux dans le fonctionnement des ganglions de la base (GB), structures sous-corticales intégratives impliquées dans l'organisation et la programmation des conduites volontaires. Le dysfonctionnement des GB est le siège de pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Elle résulte de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc), petite structure du mésencéphale qui innerve le striatum. La perte des neurones DA de la SNc aboutit à une diminution massive des contenus en DA striatale perturbant l'équilibre entre les deux voies de sortie du striatum (directe et indirecte) et à une hyperactivité des interneurons cholinergiques (ACh). Ce projet vise à comprendre l'action de ces interneurons sur le fonctionnement des GB en situation normale et pathologique dans un modèle expérimental analogue à la Maladie de Parkinson, chez la souris. Les principaux symptômes moteurs de la

maladie de Parkinson sont souvent associés à des troubles cognitifs et émotionnels, qui peuvent apparaître précocement. Le striatum contient le plus haut niveau d'ACh dans le cerveau, de récepteurs muscariniques et autres marqueurs liés à l'ACh. Ce travail combinera une approche optogénétique et pharmacologique et comportementale. L'approche optogénétique est en effet la seule qui nous permettra d'activer ou d'inhiber de façon spécifique les interneurons ACh. Nous utiliserons en parallèle une approche pharmacologique afin de cibler les récepteurs cholinergiques (muscariniques principalement) impliqués dans les effets observés. Nous analyserons l'impact comportemental de la modulation des interneurons ACh dans différents tests comportementaux permettant de mettre en évidence les symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson.

Notre approche est principalement comportementale. De telles études nécessitent un nombre relativement important de sujets du fait d'une variation interindividuelle importante. Le nombre de 8 à 10 souris par groupe expérimental est le minimum nécessaire pour satisfaire aux critères statistiques et donner des résultats fiables. Du fait des variations interindividuelles et des approches chirurgicales prévues nous utiliserons des groupes de 14 animaux afin d'obtenir in fine des groupes de 10.

L'analyse statistique (ANOVA ou Kruskal-Wallis et tests a posteriori) est robuste et fiable lorsqu'on obtient ce nombre minimum par groupe.

1006- Le but de ce projet est d'étudier les effets anti-hyperglycémiant hypoglycémiant/ anorexigéniques du Tagatose et de décrypter les mécanismes cellulaires et les molécules impliquées dans cette régulation en utilisant des souris ayant subi un régime avec un régime standard (RS) ou hypercalorique (RHC). Il s'agira plus particulièrement d'étudier les paramètres suivant:

1- Caractère hypoglycémiant/ anorexigénique du Tagatose : Suivi de l'OTTT (Oral Tagatose Tolerance Test) permettra d'étudier l'effet dose- dépendant du Tagatose sur la tolérance.

2- Au niveau intestinal : Analyser l'effet d'une charge orale du Tagatose sur l'abondance et l'adressage des transporteurs entérocytaires de sucres. Par ailleurs, nous déterminerons l'expression génique et protéique des peptides satiétogènes intestinaux.

3- Au niveau hépatique : Etudier l'impact du Tagatose sur l'expression génique et protéique des protéines impliquées dans la lipogénèse de novo.

4- Au niveau adipeocytaire : Etudier l'effet du Tagatose sur les enzymes clés de l'adipogénèse.

5- Au niveau hypothalamique: Analyser l'effet du Tagatose sur l'expression des peptides orexigènes et anorexigènes modulant la prise alimentaire et le poids corporel.

6- Au niveau musculaire: Etudier l'effet du Tagatose sur les médiateurs impliqués dans le stockage du sucre.

7- Au niveau Microbiote : Ce volet permettra de décrypter l'effet du Tagatose sur la composition du microbiote.

1007- 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, particulièrement parmi les bactéries à Gram négatif, est devenu une préoccupation des pouvoirs publics.

L'utilisation d'alternative aux antibiotiques devient aujourd'hui une priorité de santé publique. Nous avons développé des liens avec une industrie spécialisée dans la fabrication de produits extraits de plantes à propriétés antibactériennes. Ces produits ont été testés in vitro dans notre laboratoire. Les résultats ont été suffisamment convaincants pour développer un projet de thèse autour de la validité in vivo de ces produits pour leurs propriétés intrinsèques antibactériennes ou leurs propriétés de synergie in vitro avec les antibiotiques. Un brevet est en cours de dépôt en collaboration entre l'entreprise et l'Université d'Angers. En raison de la composition de ces produits, une formulation nanoencapsulée était indispensable pour obtenir une biodisponibilité. Une thèse de type CIFRE en contrat entre l'Université d'Angers et l'industriel a pour objectif suivant: tester l'efficacité in vivo de deux produits antibactériens: AT 110 (4 composés majoritaires de 3 Huiles essentielles), ainsi qu'une formulation nanoencapsulée de ce même produit (qui évoluera en fonction des résultats de sa biodisponibilité in vivo), dans un modèle de cage sur des rats. Ce modèle consiste en des cylindres de Téflon appelés cages, qui sont implantés en sous cutané sur le rat et infectées 3 à 4 semaines après l'implantation chirurgicale, par inoculation locale percutanée d'*Acinetobacter baumannii* (Gram négatif) ou *Staphylococcus aureus* (Gram positif). La présence d'un exsudat inflammatoire dans la cage, désigné comme fluide de la cage, permet une évaluation directe de l'efficacité et des propriétés pharmacocinétiques de n'importe quel agent antimicrobien qui s'accumule dans ce compartiment, après une administration percutanée (efficacité) ou systémique (efficacité et pharmacocinétique). L'efficacité des produits antimicrobiens est évaluée en comparant les cultures quantitatives de chaque fluide de cage avant et après 7 jours de thérapie antimicrobienne.

1008- Ce projet s'inscrit dans l'étude des changements métaboliques qui sont observés chez des sujets obèses ou diabétiques qui subissent une chirurgie de l'intestin. La chirurgie bariatrique est l'une des approches les plus utilisées pour lutter contre les formes sévères d'obésité chez l'homme. Il a été observé chez ces patients, une amélioration rapide et significative de paramètres métaboliques comme une amélioration de la glycémie (lorsqu'ils sont diabétiques) avant toute perte de poids. Il existe sûrement des signaux (nerveux ou hormonaux) qui sont modifiés de façon précoce lors de cette chirurgie. Nos modèles de rats comprenant 96 rats Wistar âgés de 6 semaines et de 36 rats Goto Kawasaki âgés de 4 mois chez lesquels cette chirurgie bariatrique sera réalisée nous permettront d'identifier ces mécanismes. Parmi les mécanismes envisagés, nous pensons que des changements de sécrétions

hormonales gastro-intestinales peuvent se produire (comme la ghreline ou le GLP1) ainsi que d'autres hormones pancréatiques (insuline, glucagon) ou du tissu adipeux (leptine, adiponectine). La chirurgie peut également avoir un impact sur le comportement alimentaire et la détection des odeurs. Ce paramètre sera également étudié. Pour ce projet, l'approche chirurgicale ne peut être substituée par une autre méthode ou technique.

1009- Le projet vise à identifier un adjuvant qui soit optimal pour la production d'un vaccin universel contre la grippe (c'est-à-dire contre de multiples souches). Il n'existe aucune donnée concernant l'efficacité comparée d'adjuvants employés par différentes compagnies pour la vaccination antigrippale que ce soit chez l'homme ou en modèle animal pertinent tel le porc. Nous rechercherons parmi les adjuvants autorisés chez l'homme, celui qui induit la réponse la plus large dans le modèle porcin avec une préparation classique de « vaccin split ». Les informations obtenues dans cette expérience seront utiles à un second projet de développement de nouveaux concepts de vaccins universels mais également au choix d'un type d'adjuvant optimal lors d'émergence de pandémie grippale. Cinq adjuvants seront testés sur des groupes de 6 porcs de 2 mois. Deux groupes témoins seront ajoutés, ce qui portera le nombre total d'animaux à 42.

1010- L'objectif du projet est de contribuer à l'évaluation du risque sanitaire lié à l'utilisation des téléphones portables. Il s'agit d'apporter des éléments de réponse aux résultats contradictoires observés dans la littérature sur les effets de signaux de téléphonie mobile, notamment sur les fonctions cognitives comme la mémoire, observés chez le rongeur ou l'homme. Une très récente étude suggère que l'exposition à un téléphone mobile augmenterait le métabolisme du glucose.

S'il est réel, un tel effet pourrait conduire à une activation neuronale, voire à la neurogenèse.

D'autres études suggèrent que l'exposition aux RF de la téléphonie pourrait déclencher une activation gliale, potentiellement liée à un processus de neuroinflammation.

Il s'agira de vérifier

(i) si le processus de neurogenèse est modifié par des expositions répétées aux signaux RF des communications sans fil, en recherchant la présence de nouvelles cellules en division dans le DG de l'hippocampe, puis d'identifier ces cellules en tant que neurones

(ii) si des expositions répétées aux signaux RF des communications sans fil sont capables d'entraîner une neuroinflammation, en recherchant plusieurs marqueurs d'inflammation (et non un seul comme dans la plupart des études existantes) au niveau des cellules gliales et microgliales, ainsi qu'une altération de la barrière hémato-encéphalique.

Pour cela, la tête de rats sera exposée à différents signaux RF des communications sans fil (GSM, UMTS, WiFi), ce qui permettra de détecter un éventuel effet de la fréquence et de la modulation du signal.

1011- L'anxiété et la dépression sont très souvent associées à des troubles du sommeil (insomnies, hypersomnies). L'altération de l'architecture du sommeil est très souvent précurseur aux symptômes anxio/dépressifs. Des patients avec des troubles du sommeil sont jusqu'à dix fois plus sujets de développer un épisode dépressif que des personnes sans troubles du sommeil. Inversement, 50 à 90% de patients dépressifs rapportent une mauvaise qualité de sommeil. Pour exemple, 20 à 80% d'entre eux souffrent d'insomnies et 10 à 40% d'entre eux souffrent d'hypersomnie, révélant ainsi un très fort lien entre la qualité de sommeil et l'humeur. Pour mieux comprendre la physiopathologie de cette détérioration du sommeil et développer des traitements spécifiques, la disponibilité de modèles expérimentaux validés par la communauté scientifique et mimant avec le plus de précision possible l'ensemble des symptômes associés à la maladie est essentiel. Il est à noter que si les modèles animaux d'anxiété/dépression se focalisent très souvent sur les symptômes cardinaux de la dépression que sont l'anhédonie et la co-morbidité anxieuse que l'on retrouve chez les patients, en revanche, très peu d'informations sont connues sur les autres symptômes de la pathologie, notamment les troubles du sommeil.

Notre laboratoire a récemment développé un modèle murin basé sur une élévation des concentrations en glucocorticoïdes qui présente des déficits comportementaux en lien avec la physiopathologie de l'anxiété/dépression. Les animaux recevant ce traitement ont révélé un phénotype anxio/dépressif dans des tests comportementaux prédictifs d'une activité anxiolytique et/ou antidépressive et une amélioration comportementale suite à un traitement par des antidépresseurs (fluoxétine, imipramine, venlafaxine, escitalopram et agomélatine).

Ce nouveau modèle, outre sa grande disponibilité et sa forte reproductibilité en regard des autres modèles animaux de la pathologie, offre la possibilité d'évaluer les perturbations du rythme circadien (états de veille/sommeil) puisqu'il a révélé un profil particulier d'activité/inactivité et des troubles du sommeil tout au long du cycle jour/nuit.

D'autre part, ces troubles du sommeil survenant très souvent avant la composante humorale, une des stratégies repose sur un traitement par antidépresseurs. Nous nous sommes aperçus que certains médicaments antidépresseurs étaient capables de corriger l'humeur et de fait le comportement mais pas le rythme veille/sommeil alors que certaines molécules possédant un mécanisme d'action particulier tendent à le suggérer. Afin de poursuivre le projet de caractérisation des troubles de veille/sommeil de ce modèle et d'aborder des stratégies thérapeutiques de correction par la compréhension des mécanismes dérégulés et les moyens d'y pallier, leur investigation

se fera chez la souris de souche C57BL/6J (wild-type, WT), au nombre de 15 à 20 animaux par groupe de traitement, par la pose d'électrodes d'enregistrement. Les avantages que présente ce modèle, outre sa grande disponibilité et la connaissance des mécanismes qui sous-tendent ces différents comportements, sont qu'il s'agit d'un modèle

présentant un sommeil polyphasique (diurne et nocturne), exprimant des altérations circadiennes marquées et que l'investigation des troubles du sommeil y est très accessible. Les seuls dommages escomptés reposent sur une micro-chirurgie de pose d'électrodes (cérébrales, musculaires et oculaires) nécessaire pour définir les stades d'éveil et de sommeil (sommeillent, sommeil paradoxal).

1012- Une supplémentation quotidienne en myo-inositol (1,2g/kg) pendant 10-15 jours permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de réduire l'accrétion de tissu adipeux blanc de façon significative (-33%) chez la souris femelle. Plusieurs études cliniques chez la femme, dans le contexte du syndrome des ovaires polycystiques (SOPK), du diabète gestationnel ou de la ménopause ont confirmé les effets bénéfiques d'une telle supplémentation sur le contrôle glycémique et la sensibilité à l'insuline. Lors de protocoles de supplémentation sur des souris mâles, l'effet insulino-sensibilisant du myo-inositol a bien été confirmé; par contre, la diminution de l'adiposité préalablement observée chez les souris femelles (-30%, $p < 0.001$) n'a pas été retrouvée, nous amenant à émettre l'hypothèse d'une possible interaction avec la sécrétion et/ou l'action des œstrogènes sur le tissu adipeux blanc.

Afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le myo-inositol pourrait moduler l'accrétion adipeuse, et afin de vérifier/tester l'existence d'un effet des hormones sexuelles féminines dans ces mécanismes, nous souhaiterions étudier l'effet d'une supplémentation en myo-inositol sur la masse de tissu adipeux blanc de la souris femelle ovariectomisée.

1013- Nous recherchons des molécules pour traiter les pathologies auto-immunes comme par exemple: l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et le psoriasis. Les molécules agissant sur les cibles d'intérêts sont sélectionnées en fonction de leurs activités dans des tests cellulaires *in vitro* et de leurs paramètres pharmacocinétiques.

Nous mettons en place un processus de screening des molécules via des tests cellulaires ou non-cellulaires *in vitro*. Ces tests permettent de réduire le nombre de composés à tester chez l'animal mais ne permettent malheureusement pas de se passer des modèles animaux.

Les composés présentant le potentiel le plus intéressant sont testés sur des modèles animaux reproduisant le plus possible la fibrose rénale chez l'homme. Les procédures expérimentales de ce projet sont de courtes durées (de 5 à 15 jours) et les animaux ne développent pas de signes cliniques. Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 10000 animaux sur 5 ans (8 650 souris et 1 350 rats). Seuls les modèles animaux nous paraissant humainement acceptables sont réalisés. Les spécificités de chaque procédure expérimentale seront étudiées en matière de prévention de la douleur, souffrance et détresse des animaux. Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux.

1014- L'objectif de ce projet est de développer de nouvelles molécules thérapeutiques basées sur le concept des récepteurs à dépendance ciblés contre le cancer.

Les récepteurs à dépendance possèdent la propriété de ne pas être inactifs en absence de ligand mais, au contraire, d'induire un processus actif d'apoptose. Au delà de l'intérêt fondamental que présente l'étude de récepteurs capables de deux signalisations - signalisation «positive» en présence de ligand dans l'environnement et signalisation «négative» en absence de ligand -, cette dualité de fonction pourrait associer ces récepteurs tant dans les processus de développement que dans la prévention de la tumorigenèse. Cette nouvelle classe de récepteurs correspond à des suppresseurs de tumeurs qui limiteraient l'échappement tumoral en induisant l'apoptose des cellules tumorales se développant en dehors du champ d'accessibilité du ligand.

Des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence que l'inactivation de la liaison récepteur/ligand entraînait l'apoptose des cellules cancéreuses.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Les récepteurs à dépendance sont impliqués dans différents cancers. Trouver une molécule thérapeutique agissant sur la voie des récepteurs à dépendance permettrait avec la même molécule de soigner plusieurs pathologies différentes.

Conformité par rapport aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

La preuve de concept *in vitro* ne suffisant pas pour valider le développement de nouveaux médicaments, nous devons utiliser des modèles animaux. Nous avons choisi, afin de nous rapprocher au plus près de la pathologie humaine, de travailler sur des cellules humaines que nous greffons en sous-cutané chez la souris immunodéficiente. En effet, ce modèle animal est le seul qui nous permette d'évaluer de manière efficace si l'injection de nouvelles molécules anticancéreuses est capable d'induire la régression, voir l'élimination, des tumeurs induites.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée (absence de signe évoquant une souffrance, taille des tumeurs $< 2000 \text{mm}^3$).

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet: Au total 6300 souris sont incluses dans le projet.

1015- La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace et parfois l'unique solution pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant le

rejet de greffe n'est pas entièrement contrôlé par les immunosuppresseurs et représente aujourd'hui l'obstacle majeur en transplantation.

Nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe à l'aide de modèles de greffes chez l'animal.

Suite à une transplantation, les antigènes du donneur vont être présentés aux cellules immunitaires du receveur. La réponse immune va alors produire des lymphocytes T mémoires spécifiques des antigènes du donneur. Si le receveur reçoit une deuxième greffe présentant les mêmes antigènes que ceux du premier donneur, la réponse immune engendrée va être plus forte due à la présence des lymphocytes T mémoires qui vont accélérer la réponse immunitaire et favoriser le rejet de greffe. En transplantation, il est courant que les personnes transplantées reçoivent plusieurs greffes. Le contrôle de la réponse immune médiée par les lymphocytes T est alors indispensable.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier les mécanismes de rejet liés aux cellules T mémoires. Nous souhaitons plus précisément tester des cellules et molécules permettant de contrôler le rejet du aux cellules T mémoires. Pour cela, nous réaliserons une greffe de peau chez le rat. Les cellules T de l'animal greffé seront alors isolées puis injectées à un deuxième animal qui recevra une greffe de cœur provenant du même donneur que la première greffe. Grâce à ce protocole, nous allons pouvoir étudier et contrôler le rejet du aux cellules T mémoires en transplantation.

1016- Récemment, nous avons trouvé que l'expression de deux gènes impliqués dans la synthèse de sucres régulatrices du comportement cellulaire se trouvent augmentée dans les cerveaux de malades Alzheimer. Jusque à nos jours, ces gènes n'avaient pas été corrélés avec la maladie.

Nous avons inhibé l'expression d'un de ces gènes dans un modèle de tauopathie, signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer, chez le poisson zébra et diminué de plus de 50% l'évolution de la maladie. Ce projet vise à étudier l'effet de l'inhibition de ces gènes chez le mammifère dans un modèle de souris transgéniques (modèle rTg4510). Ces souris expriment la protéine tau humaine avec une mutation qui induit le développement d'une tauopathie caractérisée par la phosphorylation anormale et l'agrégation d'une protéine appelée tau.

Notre objectif est de démontrer que la modulation de l'expression des gènes identifiés chez le malade, permet de réguler le développement et/ou l'évolution de la maladie chez le mammifère, ceci sera démontré par la modulation de l'expression de la phosphorylation de tau.

La stratégie expérimentale sera de sous-exprimer et sur-exprimer ces gènes dans les cerveaux d'animaux rTg4510 adultes pour analyser en suite des caractéristiques définies de la pathologie par des techniques histologiques et biochimiques.

Ce projet permettra de clairement confirmer l'importance de ces enzymes dans le développement/évolution de la maladie chez le mammifère avec, comme conséquence, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique.

La tauopathie est une maladie humaine et la souris est la seule espèce de mammifère actuellement modifiée pour exprimer la protéine humaine avec la mutation qu'induit la maladie.

Le modèle est déjà caractérisé pathologiquement et biochimiquement, il est disponible commercialement. Le protocole utilisé dans ce projet a été conçu pour obtenir un maximum d'informations avec un nombre d'animaux optimisé. Trois groupes de souris seront inclus : 1) un groupe utilisé pour valider l'efficacité des transfections, 2) un groupe pour étudier l'effet des sous-expressions, et 3) un groupe pour étudier l'effet des sur-expressions. Chaque groupe sera subdivisé en sous-groupes de 6 animaux afin d'étudier l'effet de la modulation de l'expression des gènes à 3 temps différents d'évolution de la maladie. Les animaux seront traités par injection intracérébrale (stéréotaxie, cortex et hippocampe, en une fois, sous anesthésie) des vecteurs lentiviraux contenant des agents permettant la sous-expression ou la surexpression des gènes. Aucun autre traitement ne sera réalisé avant la mise à mort des animaux (par injection d'une surdose de pentobarbital), ce qui permettra de récupérer le tissu cérébral pour son analyse histologique et biochimique. Le projet utilisera environ 120 animaux.

La modulation de l'expression des enzymes étudiées permettra de mieux comprendre leur rôle dans les tauopathies dont fait partie la maladie d'Alzheimer, et de clairement définir son potentiel thérapeutique.

1017- Le rejet des organes transplantés est aujourd'hui contrôlé par l'administration de traitements immunosuppresseurs aux patients. Cependant, ces traitements deviennent toxiques à long terme. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors nécessaires pour réduire la dose et la durée d'administration des traitements immunosuppresseurs.

Les thérapies cellulaires représentent l'une de ces alternatives. Ce projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier et améliorer les propriétés tolérogènes des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). Nous étudierons des MDSCs générées dans deux contextes d'inflammation. D'une part, des MDSCs produites in vitro à partir de cellules de moelle osseuse. Ces cellules sont induites via un cocktail de cytokines mimant l'environnement tumoral. Nous nous intéresserons à un second type de MDSCs amplifiées in vivo chez des souris soumises à une inflammation généralisée suite à l'administration de LPS (lipopolysaccharide).

Nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la transplantation d'organes, la morbidité et la mortalité restent beaucoup plus élevées dans la population de patients transplantés que dans la population générale. Ceci est principalement dû aux effets secondaires des immunosuppresseurs et au phénomène de rejet. Ainsi l'un des objectifs en transplantation est de comprendre les

mécanismes du rejet et d'induire une tolérance spécifique du greffon qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur.

La transplantation est un processus dont la complexité ne permet pas une étude basée exclusivement sur des expériences réalisées *in vitro* et nécessite également des étapes avant le passage à l'Homme. Pour en étudier les mécanismes, nous devons donc faire appel à des modèles de greffes chez l'animal.

Un des modèles que nous avons mis au point dans notre unité est le modèle de greffe de peau chez la souris. Ce modèle présente de nombreux avantages, notamment la survie du greffon est facile à suivre. Par rapport à d'autres modèles, nous pouvons profiter d'un seul donneur pour greffer 3-4 receveurs. De plus, un plus grand nombre d'outils sont développés chez la souris en comparaison avec d'autres animaux, ce qui facilite le travail de recherche.

Ce modèle est également utilisé par d'autres équipes dans l'unité et a permis d'effectuer des travaux qui ont donné lieu à des publications.

1018- La Sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune atteignant avec prédilection les adultes jeunes de sexe féminin. C'est une affection chronique caractérisée par une atteinte inflammatoire et une démyélinisation du système nerveux central (SNC). Elle évolue le plus souvent par poussées avec une réparation spontanée possible de la myéline, du moins au début de la maladie. Mais au fur et à mesure que la maladie évolue, la réparation est de moins en moins bonne. Les traitements actuels visent à modifier la composante immunologique de la maladie (immunomodulateurs). Je cherche à étudier les moyens de favoriser la réparation de la myéline. On sait que les stéroïdes sexuels peuvent jouer un rôle bénéfique sur la myélinisation du SNC au cours de développement chez les rongeurs et sur la prévention de la démyélinisation au cours de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale, modèle animal de SEP. Je cherche à utiliser certains progestatifs et l'estradiol dans un but thérapeutique, en les administrant à des souris femelles, après induction d'une démyélinisation centrale.

Le but ultime de ces expériences est de pouvoir offrir aux femmes atteintes de SEP un bénéfice secondaire neurologique à un moyen de contraception qu'elles pourraient utiliser pendant leur vie de femme.

1019- De nombreux progrès au cours des dix dernières années ont permis d'améliorer le traitement des cancers; il est toutefois important de noter que le taux de mortalité lié aux cancers, corrigé selon la taille et l'âge de la population, n'a chuté que de 5 % entre 1950 et 2005 (source : U. S. National Center for Health Statistics). Les cancers métastatiques demeurent extrêmement difficiles à soigner et les traitements proposés ne permettent en majorité qu'un effet à court terme.

C'est pour cela que de nouvelles stratégies sont envisagées afin d'optimiser l'efficacité du système immunitaire pour cibler et éradiquer les tumeurs. L'immunothérapie par transfert adoptif fait partie de ces nouvelles approches et se base sur l'injection chez le patient de cellules immunes reconnaissant spécifiquement la tumeur, préalablement amplifiées et manipulées dans le laboratoire. Malgré les grandes avancées réalisées pour le développement de ces immunothérapies anti-tumorales, l'optimisation de la persistance et de l'efficacité des cellules T transférées demeurent un challenge important.

Dans le projet proposé, nous proposons d'étudier les conséquences des traitements par radiothérapie ou par chimiothérapie sur l'environnement de l'hôte afin d'optimiser la persistance et l'efficacité de lymphocytes T anti-tumoraux. Nous nous intéresserons plus précisément à l'impact de ces traitements sur le devenir et l'efficacité des cellules anti-tumorales transférées.

1020- Les vaisseaux sanguins des tumeurs représentent la première barrière et la zone d'interaction principale entre les cellules cancéreuses au sein des tumeurs solides et la circulation sanguine. En particulier, les cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins régulent l'infiltration dans les tumeurs de cellules des leucocytes présents dans la circulation sanguine et qui sont normalement capables de détruire les cellules cancéreuses. L'endothélium joue donc un rôle majeur dans le contrôle de la croissance tumorale. Au cours de nos travaux récents, nous avons découvert que des gènes et des microARNs sont exprimés dans l'endothélium de façon à maintenir cet endothélium dans un état qui ne permet pas le passage des cellules de l'immunité dans les tumeurs. Ces gènes pourraient donc jouer un rôle majeur dans la croissance tumorale et la découverte de ce nouveau concept est au cœur de notre projet. Celui-ci consiste à identifier l'ensemble de ces gènes et microARN par cribles à haut débit *in vitro* puis à étudier le rôle de ces gènes dans la croissance tumorale, la vascularisation tumorale et la métastase en utilisant des modèles murins.

Nous avons besoin d'expérimentation animale pour étudier les patrons d'expression de ces gènes et microARN au cours du développement et chez l'adulte et pour étudier leurs rôles dans des modèles de croissance tumorale sous-cutanée ou dans la glande mammaire de souris normales, immunodéprimées ou génétiquement modifiées, avec résection ou non des tumeurs primaires dans le cadre du suivi des métastases.

1021- Les perturbateurs endocriniens (PEs) sont des micropolluants présents dans l'environnement. En interagissant avec le système endocrinien des vertébrés, ils sont capables d'altérer la fonction de reproduction suite à une exposition directe de l'individu

Ces altérations sont parfois transmises à la descendance de l'individu via des effets transgénérationnels, sans exposition directe de cette descendance aux PEs. L'éthinylcestradiol-17-a (EE2) est le composant principal des pilules contraceptives et des traitements hormonaux substitutifs. Non métabolisée par l'organisme et peu éliminée par les

traitements des stations d'épuration, cette hormone de synthèse est largement disséminée dans l'environnement et constitue un contaminant majeur des milieux aquatiques (profonds et de surface). Une étude a été développée dans notre laboratoire en 2011 afin d'évaluer les effets de l'exposition à l'EE2 sur la fonction de reproduction, chez la souris. L'objectif de cette étude était de modéliser chez la souris une exposition environnementale à l'EE2 possible chez l'humain, chez les animaux de rente ou de faune sauvage. Ainsi, des souris ont été exposées soit à une dose environnementale (0,1 µg/kg/jour; lot 1), soit à une dose pharmacologique (1 µg/kg/jour (contrôle positif) ; lot 2) d'EE2 pendant des phases critiques du développement (depuis la vie in utero jusqu'à la puberté; génération F1). D'autres souris n'ont pas été exposées à l'EE2 pendant ces mêmes périodes (témoins; lot 3). Par cette étude, nous avons démontré que les mâles exposés à l'EE2 jusqu'à leur puberté (lots 1 et 2) présentent un comportement sexuel exacerbé par rapport aux mâles témoins, de façon dose d'EE2 dépendante. Les animaux de la génération F1 ont été mis en reproduction en intra-lot pour obtenir une génération F2, puis une génération F3 a été obtenue à partir de la génération F2 ; aucun individu d'aucun des 3 lots des générations F2 et F3 n'a été exposé à l'EE2. Néanmoins, nous avons observé que le phénotype de comportement sexuel exacerbé est transmis aux mâles des générations F2 et F3. L'objectif de ce projet est d'obtenir les individus mâles des générations F4 et F5 afin d'évaluer leur comportement sexuel. Ce projet permettra d'une part de caractériser la transmission du phénotype et sa possible persistance sur plusieurs générations, et d'autre part de collecter en post-mortem chez ces mâles des tissus dont l'analyse conduira à l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans cette transmission.

1022- Le mélanome est une tumeur cutanée issue de mélanocytes épidermiques et peut se développer à n'importe quelle zone anatomique comportant des mélanocytes. Son incidence double tous les 10 ans depuis 50 ans dans tous les pays à population blanche et est évaluée à environ 4000 à 6000 nouveaux cas diagnostiqués par an en France. En dépit d'un dépistage plus précoce de la maladie et de l'exérèse complète de la lésion primitive, le mélanome reste un cancer létal par sa forte capacité à métastaser dans différents organes du corps. Un des défis majeurs de l'immunologie antitumorale repose sur l'induction efficace et prolongée de la phase effectrice de la réponse immune antitumorale. L'identification des antigènes associés aux tumeurs (TTA) et la mise en évidence de la présence d'effecteurs cytotoxiques au sein des tumeurs solides ainsi que leur importance dans l'élimination des cellules tumorales ont conduit au développement d'approches d'immunothérapies anticancéreuses spécifiques.

La destruction des cellules tumorales par le système immunitaire est sous le contrôle de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui régulent étroitement les fonctions effectrices des lymphocytes T. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité cytotoxique des effecteurs T antitumoraux représente donc un enjeu considérable pour le développement d'approches d'immunothérapie visant à éradiquer la tumeur. La molécule inhibitrice du TCR (récepteur des cellules T), CD5, contribue à la régulation de la réponse T cytotoxique antitumorale. L'étude de la réponse antitumorale dans un modèle in vivo de souris déficiente pour l'expression de CD5 (CD5-KO) a montré un retard de la croissance tumorale par rapport aux souris sauvages (CD5-WT).

Nous souhaitons développer une approche vaccinale dans les souris CD5-KO et CD5-WT, transplantées avec le mélanome murin B16-F10 (ou B16-F10 transfectées avec Rantes pour obtenir une meilleure infiltration des lymphocytes T), que nous immuniserons avec un lentivirus recombinant codant un antigène tumoral (TRP2).

Nous caractériserons la réponse T CD8 ainsi que la réponse T CD4 spécifique du mélanome, en particulier la réponse Th17 qui semble amplifiée dans les souris CD5-/-.

1023- La rupture du ligament croisé antérieur (LCA) est une pathologie très fréquente avec comme principale risque évolutif une dégradation accélérée du genou vers l'arthrose.

Le potentiel de cicatrisation spontané du ligament étant faible le traitement recommandé pour les ruptures du LCA est l'autogreffe tendineuse. Si cette procédure donne de bons résultats, elle a cependant deux limites majeures : une morbidité du site donneur et une impossibilité de reprise en cas d'échec. Un substitut ligamentaire artificiel permettrait donc d'améliorer le traitement des ruptures du LCA en supprimant les principales limites du traitement actuel. Le centre des matériaux de l'école des Mines de Paris (Mines-ParisTech) a conçu une prothèse ligamentaire en fibre d'hydrogel d'alcool polyvinylique (PVA) pour laquelle il a récemment développé un procédé de fabrication et validé les performances mécaniques in vitro, possédant des propriétés de tissage spécifique ainsi qu'un revêtement adapté d'hydroxyapatite pour améliorer l'ostéointégration. In vitro, ce substitut ligamentaire est particulièrement intéressant pour ses propriétés mécaniques. Il est cependant indispensable d'évaluer son comportement in vivo avant d'envisager une implantation chez l'homme. L'objectif de cette étude est d'analyser l'intégration osseuse de ce substitut ligamentaire. Sur un modèle animal le plus fréquemment utilisé en recherche orthopédique, et dont la littérature dispose le plus grand nombre de données : le lapin New Zealand White ; un toron de fibres de PVA revêtu d'hydroxyapatite sera implanté dans un tunnel osseux tibial, puis l'ostéointégration sera analysée à 6 semaines en imagerie et en histologie standard. Pour des raisons éthiques, le nombre d'animaux utilisés sera très limité, mais suffisant néanmoins pour conserver une puissance statistique.

1024- Les PIDC sont des neuropathies inflammatoires dysimmunes dont le diagnostic est obtenu grâce aux données de l'anamnèse, de l'examen clinique et de l'électroneuromyogramme. Le caractère autoimmun des PIDC est étayé notamment par la bonne réponse aux traitements immunomodulateurs et immunosuppresseurs. Pour autant, à ce jour, dans la littérature, il n'existe pas de biomarqueur validé des PIDC. La mise en évidence d'un tel biomarqueur permettrait un diagnostic et donc un traitement précoce des patients. Au sein de la cohorte des patients PIDC, il

permettrait aussi de définir des sous-groupes susceptibles d'évoluer différemment le cas échéant avec des traitements différents. Enfin, la connaissance d'un biomarqueur pourrait permettre d'illustrer ou quantifier la réponse au traitement

1025- La régulation du développement et de l'activation des lymphocytes T implique la détection et l'intégration de signaux différents, incluant la reconnaissance de l'antigène, l'interaction avec d'autres cellules et la stimulation par des facteurs solubles, tels des cytokines ou des facteurs de croissance. Chacun de ces stimuli extérieurs active des voies de signalisations intracellulaires qui sont doivent être soumises à une régulation stricte, afin de déclencher une réponse fonctionnelle appropriée. Nous avons récemment identifié des modifications

post-traductionnelles de protéines de signalisation lymphocytaires permettant de réguler négativement l'activation des lymphocytes T *in vitro*. Nous souhaitons déterminer l'effet de ces modifications *in vivo* sur le développement, la différenciation et les fonctions effectrices des lymphocytes. Ces modifications pourraient être impliquées dans le contrôle des interactions entre lymphocytes T et leur environnement, leur mobilité dans les organes lymphoïdes, ou encore leur adhérence à la matrice extracellulaire ou à d'autres types cellulaires. En particulier, nos résultats et d'autres données de la littérature suggèrent que l'inhibition de ces modifications pourrait améliorer les réponses anti-tumorales des lymphocytes T CD8+. Nous souhaitons donc tester ces hypothèses en utilisant un modèle de souris génétiquement modifiées et des approches complémentaires *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats attendus de ce projet pourraient permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant les réponses immunes et aider ainsi à identifier de nouvelles approches thérapeutiques contre les cancers ou d'autres pathologies. En raison de la complexité des facteurs et des types cellulaires impliqués dans les réponses immunes, il n'est pas possible de remplacer les modèles animaux dans cette étude.

Toutefois, nous essayerons de réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés.

Nous conduirons des tests préliminaires avec un nombre limité d'animaux permettant d'optimiser les conditions expérimentales. De plus, nous utiliserons des méthodes d'imagerie non invasives permettant un suivi longitudinal du développement de tumeurs et une réduction de la durée des expériences. Enfin, nous essayerons de recueillir un maximum d'informations sur la réponse immune induite par la tumeur, en prélevant les organes lymphoïdes et les tumeurs des souris euthanasiées à la fin des expériences et en conduisant des analyses supplémentaires sur les cellules ou les tissus isolés.

1026- La bactérie *Helicobacter pylori* infecte l'estomac de la moitié de la population humaine mondiale. Cette infection peut atteindre jusqu'à 90% de la population dans les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés, entre 30 et 40% des adultes sont infectés chroniquement. Après acquisition de la bactérie durant l'enfance, l'infection par *H. pylori* devient chronique et persiste plusieurs dizaines d'années voire toute la vie. Bien que cette infection provoque toujours une gastrite chronique, elle est asymptomatique dans la grande majorité des cas. Parmi les personnes infectées, environ 10% développeront un ulcère gastrique ou duodéal. L'infection par *H. pylori* est également à l'origine de pathologies plus sévères comme l'adénocarcinome gastrique qui touche entre 1 à 3% des personnes infectées ou le lymphome gastrique du MALT dont l'incidence est d'environ 0,3%. *H. pylori* a été classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer comme carcinogène de classe I, c'est-à-dire directement associée au développement du cancer gastrique chez l'homme. On estime que l'infection par *Helicobacter pylori* est responsable de 60 à 90 % des cas de cancers gastriques et qu'elle cause le décès de près de 800 000 personnes dans le monde chaque année.

La relation entre l'infection par *H. pylori* et le développement de lésions cancéreuses gastriques a pu être mise en évidence d'une part par des études épidémiologiques mais aussi en grande partie par le développement de modèles animaux, en particulier souris et gerbille. L'établissement de ces modèles dans de nombreux laboratoires et dans notre groupe de recherche a constitué une contribution majeure à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du développement de lésions cancéreuses gastriques dues à l'infection par *H. pylori*. Cependant, ces mécanismes sont encore très partiellement compris. Dans notre laboratoire, nous cherchons à mieux comprendre comment *H. pylori* est capable d'établir une infection gastrique persistante et comment cette infection chronique conduit à des pathologies aussi graves que le cancer gastrique. Pour ces études, nous utilisons des modèles animaux, souris et gerbille mongolienne. Nous cherchons d'une part à identifier les facteurs de la bactérie qui sont importants pour sa capacité de colonisation, sa virulence et son effet pro oncogène. D'autre part, nous étudions la réponse de l'hôte à l'infection par *H. pylori*. Le développement du modèle animal nous a permis de démontrer précédemment un effet mutagène direct de l'infection au niveau des cellules épithéliales gastriques en association avec l'inflammation chronique induite. Nous analysons les mécanismes d'instabilités génétiques et d'altérations épigénétiques induits par *H. pylori* qui sont parmi les événements précoces importants dans l'initiation du processus de cancérogenèse. Finalement, nous testons l'effet de composés chimiques sur la colonisation de ces modèles animaux par *H. pylori*. Ces molécules pourraient être de bons candidats pour l'éradication de l'infection dans la population humaine. Ce type d'étude soulève de plus en plus d'intérêt du fait d'une forte incidence de souches de *H. pylori* résistantes aux antibiotiques couramment utilisés. Nos recherches sont susceptibles d'ouvrir la voie vers la mise au point de nouveaux tests diagnostiques et de traitements alternatifs contre *H. pylori*. Le modèle de colonisation de la souris par *H. pylori* est parfaitement adapté aux questions scientifiques que nous abordons. Nous utilisons plus rarement le modèle de colonisation de la gerbille. Cependant, celui-ci est actuellement le seul à reproduire toutes les pathologies humaines y compris le cancer.

Pour nos projets sur une durée de cinq ans, nous estimons à un nombre total de 4888 souris et de 480 gerbilles. Il existe des modèles de culture de cellules gastriques que nous utilisons in vitro mais qui ne peuvent en aucun cas permettre d'étudier les lésions gastriques associées à une infection chronique par *H. pylori* ni mimer la réponse inflammatoire induite. De plus, cette bactérie a la capacité d'établir une infection chronique sur des décennies grâce à ses propriétés d'adaptation aux conditions hostiles de l'environnement gastrique ainsi qu'à sa faculté à développer des mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Actuellement il n'y a que le modèle in vivo chez l'animal qui permette d'être le plus proche de ce qui se passe dans un estomac humain.

1027- Le système vasculaire est essentiel au développement embryonnaire et intervient également dans diverses pathologies. Comprendre l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires nécessaires au développement vasculaire pourrait conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

A la naissance, la rétine de souris est dépourvue de vascularisation propre et celle-ci se met progressivement en place lors du développement postnatal. La mise en place des vaisseaux sanguins rétiniens rassemble toutes les étapes du développement vasculaire à savoir l'initiation, l'expansion, la maturation et la différenciation des vaisseaux sanguins. En réalisant des injections intraoculaires de produits biologiques (anticorps, siRNA, inhibiteurs de microARN), il sera alors possible de mesurer l'impact de ces inhibitions sur le développement vasculaire rétinien.

Des travaux préliminaires réalisés in vitro permettront de sélectionner les produits biologiques prometteurs qui seront ensuite testés in vivo. Les injections intraoculaires des produits biologiques seront réalisées chez des souris anesthésiées (entre la naissance et 3 jours de développement postnatal) sous loupe binoculaire. Les animaux seront rendus à leur mère durant trois jours avant d'être sacrifiés pour prélever les yeux et disséquer les rétines. Ces rétines seront étudiées par extraction d'ARN, par hybridation in situ ou par immunofluorescence in toto.

Trois expériences indépendantes seront réalisées pour chaque type d'injection nécessitant donc l'utilisation de 36 animaux

1028- Le contexte du projet concerne la chirurgie à minima, comme la coelioscopie, utilisée pour mettre en place des dispositifs médicaux sous contrôle endoscopique, en limitant le recours à des techniques chirurgicales invasives. Les études les plus avancées dans ce domaine visent à développer des polymères à mémoire de forme, capables de changer de forme en réponse à un stimulus environnemental (variation de température ou d'humidité, par exemple), pour l'élaboration d'implants, de stents, ou de fils de suture. L'un des avantages principaux est la facilité d'introduction des dispositifs par leur faible encombrement, avant recouvrance de la forme post-opératoire. Le but du présent projet est de développer et valider des matrices à mémoire de forme en amidon, polymère naturel, pour des applications thérapeutiques médicales en tant que dispositifs médicaux implantables. Ces matrices denses présentent les avantages d'être obtenues à partir d'une matière première très peu coûteuse et d'un procédé simple. Elles ont des propriétés de biorésorbabilité intéressantes qui ont été démontrées par des essais préliminaires d'implantation chez le rat.

Il s'agit ici de valider chez le porc la faisabilité de mise en place par sialendoscopie d'un stent de ce type dans les canaux salivaires puis d'évaluer sa tenue, sa tolérance et sa cinétique de résorption.

1029- Les traitements anticancéreux visent à éradiquer les cellules tumorales avec une haute spécificité. De nombreux efforts ont été réalisés durant cette dernière décennie pour développer des thérapies à la fois spécifiques et non génotoxiques. Dans ce contexte, les traitements basés sur l'immunothérapie sont très prometteurs du fait de leur capacité à distinguer les cellules normales des cellules néoplasiques avec des effets secondaires moindres que les chimiothérapies conventionnelles. Malheureusement, les approches d'immunothérapie actuelles ont eu jusqu'ici des succès limités. Les stratégies développées par les cellules tumorales pour échapper à la réaction immunitaire pourraient être la cause de ces échecs, mais une activité peu ou pas efficace des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques pourrait aussi être responsable. Dans ce contexte, et en utilisant des tumeurs murines comme modèle, l'objectif de ce projet est d'établir une signature moléculaire des lymphocytes infiltrant les tumeurs OE!!].

Nous avons établi, à partir des lymphocytes du sang périphérique (PBL) et des TIL d'un patient atteint d'un carcinome pulmonaire, plusieurs clones CTL spécifiques d'un épitope tumoral codé par un gène *O*-actinine-4 (*ACTN4*) muté. De manière intéressante, bien que ces clones expriment exactement le même TCR et possèdent le même potentiel lytique, seuls les TIL sont capables de lyser la cible tumorale autologue. Nous avons montré que la molécule CD5, inhibitrice du signal TCR, joue un rôle clé dans la régulation de la réponse CTL antitumorale. En effet, les lymphocytes T spécifiques de la tumeur sont capables de s'adapter au microenvironnement tumoral, en particulier au niveau d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-peptide, en régulant négativement le niveau d'expression de CD5 afin de potentialiser leur activité cytotoxique. Par ailleurs, nous avons démontré que la molécule CD5 joue un rôle clé dans la protection des lymphocytes T circulants de la mort induite par activation (activation-induced cell death, AICD) en contrôlant le niveau d'expression de FasL. Nos travaux plus récents ont montré que l'intégrine α E(CD103) β 7, est également impliquée dans la potentialisation de l'activité cytotoxique antitumorale des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant les tumeurs pulmonaires humaines. En effet, l'interaction de cette intégrine, souvent exprimée par les TIL, avec le marqueur des cellules épithéliales E-cadhérine sur la tumeur, est nécessaire à la polarisation des granules cytotoxiques et leur exocytose pour déclencher la lyse. Nos résultats indiquent aussi que le TGF- β 1, souvent abondant dans les tumeurs, joue un rôle clef dans cette induction.

Mon travail consiste à développer des modèles murins afin d'étudier le rôle de l'intégrine CD103 dans la potentialisation de la réponse immunitaire antitumorale. Nous avons transfecté la tumeur pulmonaire LL2 (Lewis lung carcinoma) avec le ligand de CD103, E-cadhérine (E) et la chimiokine CCL5 (Rantes ou R) avant de les greffer dans les souris C57BL/6 (WT, CD103-KO) afin d'optimiser le recrutement et la rétention des lymphocytes T.

1030- Le cancer du poumon correspond au cancer le plus fréquent et le plus meurtrier dans le monde. La survie à 5 ans de l'ensemble des patients n'est que de l'ordre de 15%. Le cancer bronchique représente donc à la fois un défi médical et un problème socioéconomique au premier rang des préoccupations de santé publique. Les traitements actuels reposent sur la chirurgie, la chimiothérapie et/ou la radiothérapie. Cependant, les tumeurs bronchiques restent partiellement résistantes à ces deux dernières thérapies, et l'approche chirurgicale n'est envisageable que chez 35 % des patients environ. L'approche immunologique est devenue un enjeu d'importance notamment grâce à sa capacité à atteindre des cibles spécifiques, sa faible toxicité et aux divers progrès de l'immunothérapie antitumorale. La découverte des TM a rendu les stratégies d'immunisation de plus en plus spécifiques. De telles approches vaccinales visent une stimulation active du système immunitaire de l'hôte, en particulier son immunité adaptative, afin d'activer spécifiquement ses lymphocytes T contre la tumeur primaire et les métastases. Malgré les résultats encourageants obtenus dans le mélanome après traitement par immunothérapie, les résultats cliniques dans le cancer bronchique demeurent encore limités en particulier à cause de l'insuffisance de la réaction immunitaire locale, de l'influence négative du microenvironnement tumoral sur cette réponse et de la résistance des cellules tumorales à l'action cytotoxique des lymphocytes T.

Les CBNPC ont été initialement décrits comme peu immunogènes, mais nos travaux antérieurs fondés sur l'établissement de lignées tumorales, à partir de prélèvements tumoraux frais et des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) autologues, nous ont permis de démontrer que ceux-ci sont immunogènes et capables d'induire une réponse immunitaire spécifique. Ces outils cellulaires nous ont permis d'identifier 2 Ag tumoraux dans les CBNPC. L'un d'eux est un Ag partagé codé par le gène CALCA. Le gène CALCA, codant pour la calcitonine (CT), est surexprimé dans plusieurs tumeurs du poumon et dans les carcinomes médullaires de la thyroïde (MTC). Ces résultats font donc de cet Ag un candidat prometteur en vaccination antitumorale. Le peptide antigénique actuellement identifié (ppCT16-25), reconnu par les CTL dans un contexte HLA.A2, est un décimère issu de la région C-terminale du peptide signal du précurseur préprocalcitonine (ppCT). Cet épitope tumoral est apprêté dans le réticulum endoplasmique par un nouveau mécanisme, indépendant des protéasomes et des molécules TAP, impliquant la signal peptidase (SP) et la signal peptide peptidase (SPP). Plus récemment, nous avons montré que les épitopes issus des séquences signal correspondent à une alternative de choix utilisée par le système immunitaire pour éliminer les tumeurs ayant perdu TAP et contourner ainsi ce mécanisme d'échappement tumoral. Nous avons également étudié l'immunogénicité de la ppCT chez des patients HLA-A2 atteints de cancers bronchiques. Nos résultats ont confirmé le pouvoir immunogène de la ppCT et ont permis d'identifier plusieurs peptides de 10 acides aminés susceptibles d'induire une activation des lymphocytes T CD8.

Notre objectif est de développer un vaccin thérapeutique dans les souris HHD fondée sur la ppCT qui permettrait d'éliminer les cellules tumorales pulmonaires qui ont modulé ou non les molécules TAP.

1031- Notre projet de recherche en cancérologie consiste à traiter par radiothérapie vectorisée des tumeurs humaines xéno greffées chez la souris. Ces travaux chez l'animal font suite à des études préalables réalisées in vitro sur des modèles de lignées cellulaires tumorales humaines. La radiothérapie vectorisée consiste à cibler les cellules tumorales à l'aide d'un vecteur (anticorps monoclonaux ou peptides) préalablement couplé à un isotope radioactif. Les cellules tumorales ainsi ciblées sont irradiées de façon spécifique et les tissus sains seront en partie épargnés.

Nous utiliserons dans notre projet un modèle de tumeurs intrapéritonéales d'origine humaine greffées chez des souris immunodéprimées. Les cellules xéno greffées seront d'origine ovarienne ou colorectale et pourront se développer sans phénomène de rejet.

Après quelques jours les greffes formeront des nodules tumoraux qui vont mimer les carcinomes péritonéales que l'on peut rencontrer chez les patients qui ont eu un cancer d'origine ovarienne ou colorectale.

Les souris sont ensuite traitées par différentes activités du radioimmunoconjugué administré en mode intrapéritonéal (IP). L'efficacité de la radiothérapie vectorisée sera évaluée sur la base du ralentissement de la croissance tumorale ou de la disparition des nodules tumoraux. Le suivi de la masse tumorale s'effectuera à partir d'imagerie par bioluminescence ou par une méthode de scintigraphie couplée à un scanner adapté au petit animal (nanoSPECT-CT).

L'imagerie par bioluminescence consiste à intégrer dans le génome des cellules tumorales destinées à être greffées un gène codant pour une enzyme, la luciférase. Une injection du substrat de l'enzyme, la luciférine en mode intrapéritonéal permet, à l'aide d'un système d'imagerie, de visualiser l'hydrolyse du substrat par son enzyme qui produit un signal bioluminescent proportionnel au nombre de cellules tumorales.

Dans notre projet les vecteurs seront couplés à différents isotopes radioactifs émetteurs soit de particules alpha, soit d'électrons Auger.

Outre l'efficacité de la radiothérapie vectorisée, nous effectuerons un suivi de la toxicité par observation de l'état clinique des souris, suivi de la masse, numération de la formule sanguine, et analyse de paramètres biochimiques rénaux et hépatiques. Afin d'étudier la biodistribution des molécules radiomarquées dans l'organisme, les souris

pourront être sacrifiées par insufflation progressive de dioxyde de carbone (CO₂) à différents temps post-injection des molécules, et les organes seront prélevés pour comptage de la radioactivité.

Des tissus ou organes (tumeur, rein, foie, rate, os etc ...) pourront également être prélevés pour analyse immunohistochimique afin d'évaluer l'expression de marqueurs (tissulaires, vascularisation, mort cellulaire etc ...) ou pour analyse par autoradiographie (distribution de la radioactivité à l'échelle tissulaire).

Nous étudierons certaines associations radiothérapie vectorisée-chimiothérapie.

Les molécules radiomarquées injectées pourront également être utilisées à des fins d'imagerie non-invasive par nanoSPECT-CT.

Nous disposons des installations et équipements nécessaires à la manipulation de sources radioactives et des dispositifs visant à assurer la radioprotection des personnes et locaux.

1032- Maintien d'un élevage de tiques, *Ixodes ricinus*, au laboratoire: la borréliose de Lyme est une infection animale transmise à l'Homme par piqûre de tiques. Les agents responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique. L'analyse de la transmission de cette maladie nécessite l'utilisation de tiques infectées et non infectées. Cet aspect constitue notre projet de recherche principal.

1033- De nombreux sites et sols pollués (SSP) posent des problèmes de gestion en France.

Lors de leur reconversion, une évaluation des risques est nécessaire prenant en compte les expositions potentielles aux polluants selon les utilisations projetées. Lorsque l'option résidentielle ou récréative est retenue la voie d'exposition majeure aux polluants est l'ingestion, et ce particulièrement pour les enfants en bas âge (0 à 3 ans). Cette sous-population a la particularité d'être surexposée par un comportement exploratoire buccal important et par une sensibilité intrinsèque aux effets toxiques des polluants (perméabilité du tube digestif, systèmes enzymatiques immatures, ontogénèse). L'US Environnemental

Protection Agency recommande de fixer à 100 mg par jour l'ingestion maximale de sol pour les enfants évoluant sur un SSP. Actuellement la qualification de ces SSP et leur requalification potentielle sont des enjeux économiques et sociétaux majeurs, nécessitant d'affiner l'évaluation quantitative du risque sanitaire (EQRS).

Se pose naturellement la question de la biodisponibilité du polluant présent dans le sol, qui peut être séquestré et de ce fait non absorbable, dépourvu de toxicité. Afin d'évaluer cette capacité du sol à piéger le polluant, le concept de biodisponibilité relative (BR) a été utilisé au laboratoire depuis 2007. Lors de l'évaluation sur les très nombreux sites existants, un test *in vitro* est préconisé (non invasif, peu coûteux et rapide) mais ce dernier doit auparavant être validé, quantitativement voir mécaniquement (représentativité biologique).

Ainsi, le projet «Evaluation du risque sanitaire lié à l'ingestion involontaire de sol- Etude des propriétés du sol sur la biodisponibilité relative des PCB » se situe à cette étape avec le porcelet comme modèle *in vivo*, substitut du jeune enfant. Cette modélisation a déjà été appliquée aux éléments traces métalliques (ETM) lors d'une thèse permettant de valider un test européen (dit UBM pour Unified Barge Method).

Ce test, validé, est aujourd'hui utilisé en Europe pour estimer l'effet de rétention du sol sur les ETM et moduler la dose d'exposition si nécessaire afin d'améliorer l'EQRS.

Le projet actuel porte sur les polluants organiques persistants de type PCB dont les mécanismes de liaison au sol diffèrent sensiblement des ETM et pour lesquels le rôle de la matière organique (quantité et qualité) est primordial. Il s'agit de valider un test mis au point par le British Geological Survey pour les POP mais également de mieux comprendre le rôle de la matière organique dans le piégeage des PCB.

Il faut noter que les animaux utilisés entrent en expérimentation en post-sevrage et ne subissent aucun prélèvement invasif (plasma volontairement non choisie comme matrice cible) jusqu'à l'abattage en fin de période expérimentale. Parallèlement, certains tissus sont valorisés dans d'autres projets: en interne, en chambres d'Ussing ou en externe, tests de transfert épidermique.

L'objectif du projet est donc de répondre à une question d'évaluation du risque sanitaire dans le cadre des SSP en apportant des éléments de valorisation d'un test *in vitro* tout en étudiant des mécanismes de l'interaction du sol et des PCB dans le tractus digestif.

1034- La mélatonine est une hormone produite la nuit et dont la durée de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit. C'est par l'intermédiaire de ces variations de durée que le cerveau est capable d'intégrer l'information photopériodique. Les mécanismes impliqués n'ont pas encore été identifiés. Pour certains c'est la présence de mélatonine pendant une grande durée qui agit sur l'hypothalamus (hypothèse dominante) pour d'autre c'est la présence d'une phase de sensibilité circadienne à la mélatonine quelques heures après le début de la nuit qui expliquerait la réponse photopériodique.

Des injections quotidiennes de mélatonine en fin d'après-midi, mime l'effet de la photopériode courte (arrêt de l'activité sexuelle). L'interprétation est que les injections quotidiennes augmentent ainsi la durée de la présence de mélatonine dans la circulation. Cette expérience est considérée comme un argument fort pour la première hypothèse. Récemment, nous avons démontré par microdialyse, en étudiant la mélatonine comme output de l'horloge circadienne, que cette hormone quand administrée agit sur l'horloge circadienne et augmente la durée de la sécrétion de mélatonine endogène. Le plus intéressant est que ce phénomène est observé encore 3 jours après l'administration de mélatonine exogène (celle-ci disparaît en 2 heures). Ceci voudrait dire que ce n'est pas l'augmentation de la durée

de la présence de mélatonine induite par /injection qui induirait l'effet "photopériode courte" mais l'action sur l'horloge circadienne, ce qui nous ramène à l'hypothèse initiale que nous défendions en 2000.

L'objet de l'expérience est de tester la validité de cette interprétation.

1 groupe Témoin A recevra de la mélatonine tous les jours pour dupliquer les expériences princeps.

1 groupe B recevra la même dose de mélatonine tous les 3 jours

1 groupe C recevra la même dose de mélatonine tous les 4 jours

1 groupe témoin D recevra le solvant

Après 8 semaines, les animaux seront sacrifiés et l'activité sexuelle déterminée classiquement par le poids des testicules et la concentration circulante en testostérone.

Si les groupes B et C présentent, comme le groupe A, une atrophie des gonades, signature du signal photopériode courte, cela voudra dire qu'en effet c'est l'action sur l'horloge qui est la clef du mécanisme d'action et cela validera notre hypothèse de la présence d'une phase circadienne de sensibilité à la mélatonine.

1035- Le test de micronoyaux est pratiqué in vivo chez des mammifères (souris ou rat), en vue de détecter des aberrations chromosomiques structurelles et/ou numériques au niveau des splénocytes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse de splénocytes obtenus par prélèvement de la rate.

Il a pour but de détecter des substances qui engendrent des lésions cytogénétiques sous forme de micronoyaux issus d'un/des fragment(s) de chromosomes ou un/des chromosome(s) entier(s).

Le Test du micronoyau in vivo a une ligne directrice OCDE (474) pour la moelle osseuse. Concernant les splénocytes, il est particulièrement justifié quand l'organe cible est la rate (en particulier en nanotoxicologie). Il n'a pas de ligne directrice, mais est réalisé selon de nombreuses publications.

1036- Le test de micronoyaux est pratiqué in vivo chez des mammifères (souris ou rat), en vue de détecter des aberrations chromosomiques structurelles et/ou numériques au niveau d'hépatocytes et résultant de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse de d'hépatocytes prélevés par perfusion in situ de foies de rats juvéniles.

Il a pour but de détecter des substances qui engendrent des lésions cytogénétiques sous forme de micronoyaux issus d'un/des fragment(s) de chromosomes ou un/des chromosome(s) entier(s).

Le Test du micronoyau in vivo a une ligne directrice OCDE (474) pour la moelle osseuse. Concernant les hépatocytes de rats juvéniles, il n'a pas de ligne directrice, mais est réalisé selon de nombreuses publications et workshops.

1037- Peu de choses sont réellement connues sur les effets de l'exercice physique sur la perception de la douleur. Il semble que l'activité physique régulière soit associée à des altérations de la perception douloureuse. Il n'existe pas de consensus sur les effets sur la douleur de l'activité physique et le niveau de condition physique semble jouer un rôle dans la perception de la douleur. Un niveau d'entraînement plus important peut aussi servir à lutter contre le stress et aider à réduire la douleur imposée par un effort physique intense. Des recherches seront nécessaires pour examiner tous les mécanismes sous-tendant ce phénomène.

Cette première étude devrait mettre en évidence des variations des seuils de perception et de tolérance de la douleur selon les niveaux d'exercice physique et selon les natures de stimuli douloureux.

Dans la littérature, les différences de nature d'activité physique et de méthode d'évaluation de la douleur génèrent une hétérogénéité des résultats. Des mesures rigoureuses et objectives sont nécessaires.

1038- Ce projet vise à étudier la cinétique de biodistribution de 2 molécules radiomarquées.

Dans une première expérience les molécules radiomarquées sont injectées chez la souris à des fins d'imagerie non-invasive de scintigraphie couplée à un scanner adapté au petit animal (nanoSPECT-CT). Le suivi sera fait sur une semaine. Aux temps déterminés par l'imagerie nanoSPECT-CT, nous étudierons dans le cadre d'une seconde expérience la biodistribution de ces 2 molécules radiomarquées dans l'organisme. Les souris seront sacrifiées par insufflation progressive de dioxyde de carbone (CO₂), et les organes prélevés pour comptage de la radioactivité. Cette étude, permet un comptage plus statistique que l'imagerie. La complémentarité des 2 expériences permet la réduction éthique du nombre d'animaux, l'ensemble des 2 expériences nécessite l'utilisation de 10 souris.

Nous disposons des installations et équipements nécessaires à la manipulation de sources radioactives et des dispositifs visant à assurer la radioprotection des personnes formées et locaux.

1039- Un enjeu majeur en ophtalmologie est de pouvoir traiter les patients par une administration contrôlée et prolongée de biomédicaments. L'efficacité d'une thérapie oculaire est liée à sa capacité à cibler le tissu d'intérêt afin d'améliorer la pénétration et la biodisponibilité du principe actif. La voie systémique impose de délivrer une quantité importante de médicaments qui entraîne des effets secondaires incommodes pour le patient. La voie topique impose de passer les barrières naturelles de l'œil (larme, faible perméabilité de la cornée, liaison aux protéines lacrymales) qui réduisent la biodisponibilité du médicament.

Les nouvelles stratégies de biothérapie, telles que l'administration d'agents anti-VEGF pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou celles d'agents anti-TNF-alpha pour les inflammations intraoculaires (uvéites), s'avèrent prometteuses en ophtalmologie. A ce jour, une procédure est largement utilisée en clinique: l'injection intravitréenne (IVT) invasive et répétée de protéines, et d'autres en cours de développement telles que les injections de cellules productrices de protéines ou des méthodes de thérapie génique virales.

Dans ce contexte, le projet de recherche présenté vise à développer une méthode de thérapie génique non virale, l'électrotransfert. Ce transfert de gène à médiation électrique dans le muscle ciliaire vise à délivrer dans la sphère oculaire des protéines thérapeutiques.

Une première preuve de concept a déjà été établie en 2005, puis l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de ce transfert de gène non viral a été démontrée dans plusieurs modèles de pathologies oculaires dégénératives et inflammatoires (rétinite pigmentaire, dégénérescence maculaire, uvéites expérimentales). Le développement de l'électrotransfert est aujourd'hui assuré par l'équipe d'une jeune entreprise innovante dans le but de mener ce projet jusqu'aux essais cliniques, puis à la mise sur le marché de cette nouvelle voie de délivrance de biomolécules dans l'œil. Ce développement nécessite la validation de l'expression d'une protéine-anti-TNF-alpha monomérique et de son efficacité thérapeutique dans un modèle d'uvéite auto-immune expérimentale (UAE).

1040- Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) est responsable d'une maladie grave caractérisée par un syndrome fébrile à manifestations hémorragiques sévères pouvant causer la mort dans 30 à 40% des cas, Principalement présent en Europe de l'Est et en Turquie, ce virus constitue une menace sérieuse pour l'ensemble des pays Européens, Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour lutter contre cette infection, Le groupe Eurosurveillance considère le développement d'un vaccin ou d'une approche thérapeutique contre le virus CCHF comme étant d'une importance majeure,

C'est dans ce contexte que la société Fab'entech veut étudier, dans un premier temps, chez le modèle murin, l'efficacité de neutralisation d'anticorps, purifiés sous forme de fragments F(ab')₂, spécifiques du virus CCHF.

Ce projet regroupe 6 procédures expérimentales dont 4 ont déjà été réalisées (validation par le CECCAPP en 2012, soit un total de 253 animaux déjà utilisés.

Les 2 autres procédures expérimentales nécessiteront 80 animaux par procédure.

Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est donc de 413 souris.

Afin de raffiner les expérimentations, les animaux sont visités au moins une fois par jour par des personnels qualifiés et expérimentés. Les premiers signes cliniques liés à la pathologie étudiée peuvent ainsi être observés et enregistrés.

1041- 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 toxicologie et de toxicocinétique par administration répétée pendant des durées de 2, 4 ou 13 semaines, réalisées chez le chien. Les résultats issues de ce projet sont réglementairement requis pour initier les essais cliniques, estimer la première dose à administrer chez l'Homme et constituer les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments auprès des autorités de santé.

Une procédure expérimentale de recherche de doses, plus courte et réalisée sur un petit nombre d'animaux, pour déterminer les doses pertinentes à utiliser dans les études réglementaires est également présentée dans ce projet. En réduisant le risque d'études ultérieures non conclusives, cette procédure contribue à optimiser le nombre total d'animaux utilisés dans le projet.

Ce projet est conçu pour être répété, en totalité ou partiellement, pour caractériser les effets toxiques de chaque nouveau candidat médicament testé. La sélection des procédures à réaliser est faite sur la base des données disponibles et de la stratégie de développement du médicament, de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. L'effectif total estimé pour ce projet est de 430 animaux sur 5 ans.

Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standard), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux exigences réglementaires. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une procédure expérimentale 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'examens, les gestes techniques. Les effectifs prévus correspondent à ceux habituellement acceptés par les autorités de santé 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.

D'autre part, pour les procédures expérimentales en administrations répétées pendant 2 à 13 semaines, 2 animaux supplémentaires sont prévus pour le remplacement d'un animal dont les résultats d'examen de pré-étude seraient non conformes aux critères d'inclusion dans la procédure, l'emplacement d'un animal agressif, etc. Ces animaux supplémentaires ne sont pas nécessaires dans les autres procédures (procédure préliminaire et procédure d'entraînement).

Les animaux supplémentaires non utilisés au terme des procédures expérimentales concernées pourront être engagés dans des procédures d'entraînement (formation professionnelle continue), de pharmacocinétique ou de métabolisme, ou replacés comme prévu par l'Art. R. 214-112 du Code rural et de la pêche maritime.

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.

1042- Nos données dans des modèles in vitro de culture de cellules tumorales de cancer du sein, nous ont permis de mettre en évidence le rôle pro-tumoral d'un facteur de croissance.

Dans la perspective du développement d'anticorps thérapeutiques contre ce facteur de croissance, nous souhaitons valider in vivo dans un modèle de greffe de cellules tumorales de cancer du sein chez la souris, que la neutralisation

de ce facteur de croissance par une molécule antagoniste permet 1/ de réduire la croissance tumorale et 2/ de sensibiliser la tumeur à des drogues chimiothérapeutiques.

L'objectif à long terme est de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps en combinaison avec des traitements conventionnels de type chimiothérapie ou radiothérapie.

1043- Notre projet est une évaluation chez l'animal de traitements par thérapie génique du syndrome Crigler Najjar (CN).

Cette maladie génétique rare et héréditaire est due à une mutation d'une enzyme hépatique qui entraîne une accumulation d'un composé neurotoxique dans la circulation sanguine et provoque des dommages cérébraux irréversibles.

Notre projet a pour but de déterminer un produit de thérapie génique efficace et sûr pour traiter cette maladie.

Nous espérons donc observer grâce à nos traitements une correction stable et suffisante des taux de ce composé toxique, sans créer de dommages ou effets secondaires.

Afin d'évaluer nos traitements dans un contexte physiopathologique, l'utilisation du modèle animal est nécessaire (il n'existe pas de modèles *in vitro* pour analyser l'efficacité de nos traitements).

Ici, le modèle relevant de notre pathologie est le rat GUNN (mutant naturel). C'est donc sur cette espèce que nos analyses seront réalisées tout au long du projet. Nous utiliserons 700 animaux sur 3 ans, ce qui est le minimum nécessaire à notre étude (voir plus loin dans ce document)

Notre stratégie est l'utilisation de la thérapie génique médiée par les vecteurs viraux AAV (dont la preuve de principe a déjà été démontrée pour cette pathologie : Seppen J and al., Adeno Associated virus vector serotypes mediate sustained correction of bilirubin UDP glucuronosyltransferase deficiency in rats. *Mol Ther.* 13, 1085-1092, 2006)

Cette stratégie de thérapie apparaît comme une des meilleures approches pour traiter le syndrome CN et la plus certaine pour arriver à l'essai clinique. Elle permettrait une correction sur le long terme et ne serait pas une thérapie trop lourde pour les patients.

1044- Le projet PRIMSTIM a pour objectif de mettre en place chez le primate non humain un dispositif médical déjà utilisé en médecine humaine pour les traitements de certaines maladies ne répondant pas à des traitements médicamenteux.

Ce modèle sera étudié par des observations comportementales et des prélèvements d'échantillons biologiques pour mieux comprendre les mécanismes d'action de ce dispositif mais aussi pour étudier sa possible utilisation dans d'autres maladies humaines invalidantes, pour lesquelles il n'est pas encore utilisé. Le nombre d'animaux utilisés sera faible. Les avantages attendus sont la mise en place d'un modèle nouveau qui permet d'avoir une utilisation restreinte de l'animal mais d'obtenir des informations pertinentes quant à l'utilisation d'un tel dispositif médical pour des maladies humaines.

Le projet permettra d'être conforme aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, le principal avantage du dispositif est qu'une fois mis en place chez l'animal, il peut être réglé à distance, ne nécessitant ainsi pas d'avoir une action invasive sur l'animal par la suite. De plus, chez le patient en médecine humaine, il est bien toléré et à une durée de vie de plusieurs années ce qui permet de collecter des données pendant un laps de temps important à partir d'un même animal. En parallèle de la mise en place du dispositif médical, les animaux seront entraînés avec les méthodes du clicker training pour permettre la manipulation des animaux et la prise d'échantillons biologiques sans avoir recours à l'anesthésie de l'animal et en réduisant le stress qu'il pourrait ressentir.

1045- Les parasites du genre *Eimeria* provoquent des maladies graves, appelées coccidioses, qui engendrent des pertes économiques importantes dans le monde principalement dans les élevages aviaires. Les symptômes des coccidioses aviaires sont une morbidité importante (animal prostré, plumes ébouriffées), des altérations de la production (diminution de l'indice de consommation), des diarrhées sanglantes et une mortalité pour les cas sévères. Face à ce fléau, il existe deux moyens de lutte: les vaccins et les molécules chimiques à effet anticoccidien qui sont administrées dès l'éclosion du poussin. Les vaccins sont onéreux et surtout sont réservés aux poules pondeuses qui ont une durée de vie bien plus importante que les poulets de chair pour lesquels l'utilisation des anticoccidiens est préférée. Cependant, l'utilisation massive des anticoccidiens depuis plus de 50 ans a induit l'émergence inévitable de populations parasitaires résistantes auxquelles les éleveurs doivent faire face. La recherche de nouvelles molécules à effet anticoccidien est donc primordiale. Au laboratoire, nous travaillons sur une nouvelle génération de molécules qui a pour objectifs d'être au moins aussi efficaces que ceux disponibles sur le marché et d'avoir des cibles parasitaires connues. L'intérêt de travailler sur les cibles est entre autres de pouvoir répondre rapidement à l'émergence de résistance en adaptant la structure du composé chimique pour lequel le parasite est devenu résistant à la cible altérée. De nombreuses molécules ont déjà été testées au laboratoire dans des expériences de cultures cellulaires infectées par des parasites. Nous avons de très bons candidats qui bloquent soit l'invasion des cellules, soit le développement des parasites. Afin d'éprouver les effets anticoccidiens de ces composés, des tests sur animaux sont maintenant nécessaires. Le modèle murin sera utilisé. Dans ce modèle, la coccidiose peut être facilement reproduite grâce à l'inoculation d'*Eimeria* se développant spécifiquement chez la souris et les symptômes et effets physiopathologiques observés sont similaires à ceux décrits précédemment chez la poule. De plus, ce modèle est particulièrement adapté au criblage de plusieurs molécules pour lesquelles la synthèse et le rendement ne permettent pas d'obtenir des quantités suffisantes pour un essai sur poulets. Afin de limiter le nombre d'animaux, l'étude sera

menée en deux étapes successives. La première visera à déterminer la toxicité des composés chez l'animal. De ces résultats découlera la mise en place de la deuxième étape avec le test de l'efficacité anticoccidienne du composé inoculé à des doses non toxiques. Lors de la première étape, 6 lots de 5 souris seront utilisés par molécule. Ces lots incluent les animaux témoins ainsi qu'un test de toxicité vis-à-vis de 5 concentrations différentes d'une molécule. Un maximum de 5 molécules sera testé par an. Dans le cas d'une molécule non toxique, l'étape 2 de l'expérimentation consistera à tester l'effet anticoccidien de la molécule à plusieurs concentrations lors d'une infection concomitante avec des *Eimeria*. Pour chaque molécule, cette étape utilisera 7 lots de 5 souris ce qui inclut les animaux témoins et le test de 5 concentrations différentes pour une molécule.

1046- Plusieurs études ont montré que les statines, composés hypocholestérolémiants largement utilisés en clinique pour des applications cardiovasculaires, ont des effets antitumoraux dans différents modèles de cancer. Il est ainsi décrit par exemple un renforcement des effets de composés de chimiothérapie ou une réduction de l'apparition de métastases selon le modèle. L'ostéosarcome est la tumeur osseuse maligne la plus fréquente. Les protocoles de traitement sont à base de chirurgie et de poly-chimiothérapie mais la survie des patients n'a pas évolué depuis quelques décennies et reste faible (30% à 5 ans) car ces tumeurs sont hautement métastatiques et souvent résistantes à la chimiothérapie. Aucune donnée n'est encore disponible pour une application thérapeutique des statines dans le cadre de l'ostéosarcome. Le protocole proposé permettra d'évaluer, chez la souris, la capacité d'un traitement par statine à amplifier la réponse à la chimiothérapie et/ou à réduire le nombre de métastases de tumeurs ostéosarcomateuses.

Ces composés sont déjà largement utilisés en clinique et pourraient, en cas d'effets significatifs, permettre de réduire les doses ou la durée de traitement par chimiothérapie dont les effets secondaires sont importants mais surtout de limiter l'apparition de métastases pulmonaires, responsables du décès des patients.

1047- 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 d'un composé naturel, IPPN, ayant des propriétés anti-inflammatoires démontrées par des études précédentes in vivo sur d'autres modèles d'inflammation, et d'un variant synthétique, IPPS, 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 24 souris femelles *Hairless Skh-1* impliquent :

- Applications cutanées de TPA pour l'induction et le maintien de l'inflammation cutanée
- Injections intrapéritonéales (i.p.) du composé naturel IPPN et de son variant synthétique IPPS
- Observation des effets cutanés des traitements
- Prélèvement de sang
- Euthanasie des animaux (anesthésie, exsanguination et dislocation cervicale).

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 le composé naturel testé et/ou son variant synthétique 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.

1048- La dyskinesie ciliaire primitive (DCP) est une maladie respiratoire rare caractérisée par une bronchorrhée chronique avec bronchectasies et une sinusite chronique. La DCP est la deuxième plus fréquente affection congénitale des voies respiratoires après la mucoviscidose. La DCP entraîne une altération du transport muco-ciliaire dans le tractus respiratoire. C'est une maladie génétique, chaque parent est porteur d'une copie du gène muté et d'une copie normale du gène responsable de la maladie, et il n'est lui-même pas atteint, car il faut que les 2 copies du gène soient porteuses d'une mutation pour être atteint.

Il existe une souris mutante qui exprime la même maladie que chez l'homme. C'est pour cela que dans ce projet nous utiliserons des souris porteuses d'une mutation dans un des gènes responsables de cette maladie car elle est un modèle parfait de la Dyskinesie Ciliaire Primitive humaine, afin d'évaluer:

A) l'efficacité de la transduction, de l'inflammation et des réactions immunitaires

Des souris anesthésiées recevront un dépôt de liquide dans chaque narine (50 microlitres) avec ou sans baculovirus et d'autres recevront un dépôt de liquide dans la trachée (50 microlitres) après intubation sous anesthésie avec ou sans baculovirus.

Les souris seront ensuite réveillées et réchauffées pour être remises dans leur cage en observation pendant une période de 48h, 1 semaine, 2 semaines. Après ce délai, les souris seront anesthésiées puis euthanasiées pour observer l'effet positif et éventuellement les effets négatifs du dépôt réalisé dans les narines ou dans la trachée. (euthanasiées/mises à mort).

L'inflammation et la réaction immunitaire seront étudiées par mesure des molécules de l'immunité (interféron, interleukines, ...) et par étude histologique des voies nasales et sinus.

L'efficacité de transduction sera évaluée par histologie (cellules colorées par la betaGalactosidase).

B) Evaluation du battement ciliaire et de la clairance ciliaire

Des souris anesthésiées recevront un dépôt de liquide dans chaque narine (50 microlitres) du baculovirus contrôle ou du baculovirus « médicament »

Les souris seront ensuite réveillées et réchauffées pour être remises dans leur cage en observation pendant une période de 48h, 1 semaine, 2 semaines. Après ce délai, les souris seront anesthésiées puis euthanasiées et une dissection de la mandibule permettra de visualiser les cils de l'oropharynx (confluence entre les fosses nasales et le fond de la bouche). Le battement de ces cils sera observé pour chaque lot avec un microscope muni d'une caméra numérique à haute vitesse d'enregistrement.

D'autres souris recevront le même traitement mais dans la trachée après intubation sous anesthésie. Après les mêmes délais, les souris seront anesthésiées puis euthanasiées et le sternum sera enlevé pour exposer la trachée. Celle-ci sera intubée pour déposer des microsphères d'agarose fluorescente. Le déplacement des microsphères fluorescentes sera suivi avec une caméra numérique.

Dans les 2 cas A et B (dépôt dans la narine ou dans la trachée), la recherche de douleur chez ces souris sera faite et traitée au besoin. Le liquide déposé n'est pas irritant mais peut induire une réaction immunitaire et/ou inflammatoire qui sera observée. La recherche de difficulté respiratoire liée à la maladie et aux manœuvres décrites ci-dessus sera faite et traitée au besoin.

Ces études chez la souris nous permettront d'évaluer la tolérance du baculovirus (inflammation, réaction immunitaire), son efficacité à transduire les cellules ciliées épithéliales respiratoires et à rétablir un battement ciliaire au niveau des sinus et de la trachée de souris car le but du projet est d'obtenir le rétablissement du battement des cils des cellules épithéliales respiratoires.

1049- Les bactéries symbiotiques de l'intestin sont 100x plus nombreuses que nos propres cellules eucaryotes. Ces symbiotes jouent un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie de son hôte, notamment au niveau de la digestion, de la production de métabolites, de la défense contre les pathogènes et du système immunitaire. Certains composés bactériens, tels que les peptidoglycanes, le LPS ou la flagelline, sont reconnus de façon innée par l'hôte grâce au « pattern recognition receptors (PRRs) », tels que NOD1, TLR4 et TLR5, respectivement. Dans ce projet, nous cherchons à comprendre l'impact de tels composés, en particulier la flagelline et sa reconnaissance par TLR5, sur le développement, l'activation et l'homéostasie du système immunitaire et la physiologie de l'hôte. Des souris transgéniques ont été réalisées qui expriment la flagelline de façon inductible et réversible dans l'épithélium intestinal, permettant un contrôle unique et absolu de la stimulation du système immunitaire par un composé bactérien.

1050- On constate que, dans 70% des cas, les résultats concernant l'efficacité des PPS déterminée *in vivo* (test réalisé par détermination de la dose minimale érythématogène chez volontaire sain) et *in vitro* (méthode spectrophotométrique réalisé sur support tel que des plaques de polyméthylméthacrylate) sont parfaitement

corrélés. Cependant, dans 30% des cas, les méthodes *in vivo* surestiment les résultats par rapport aux méthodes *in vitro*. L'étude des ingrédients présents dans les PPS a permis de mettre en évidence des molécules dont l'effet anti-inflammatoire par voie topique a pu être démontré. Il s'agit d'ingrédients tels que le bisabolol, l'allantoïne ou l'énoxolone. Par ailleurs, on a pu montrer que les filtres, molécules actives des PPS, eux-mêmes, possédaient dans la majorité des cas une activité anti-inflammatoire.

1051- Les adénocarcinomes gastriques à cellules indépendantes (ADCI) sont un sous-type d'adénocarcinomes gastriques caractérisés sur le plan histologique par un contingent majoritaire de cellules indépendantes. Les ADCI ont une histoire naturelle et une épidémiologie différentes des adénocarcinomes gastriques non à cellules indépendantes (ADNCI).

Plusieurs études cliniques ont ainsi permis de fortement suggérer que ces ADCI, dont l'incidence est en forte augmentation, ont un pronostic plus sombre, notamment du fait d'une lymphophilie et d'un tropisme péritonéal plus marqué, et possèdent des propriétés de chimiorésistance comparativement aux ADNCI. Ces caractéristiques en font un enjeu majeur en termes de santé publique et expliquent l'urgence à comprendre la biologie de ces tumeurs pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'ensemble de ces observations cliniques supposent notamment des voies de carcinogenèse et un mode de diffusion métastatique différents, actuellement inconnus. Il est donc indispensable pour tester l'hypothèse d'une évolution préférentielle sous forme de carcinose péritonéale, et pour étudier uniquement les « facteurs tumeur » de mettre en place un modèle animal murin pour :

S'affranchir des variations interindividuelles et éliminer les « facteurs hôtes » liés au patient en utilisant des souris nude, toutes semblables car issues de la même souche animale

S'affranchir des « facteurs environnementaux » grâce au modèle animal en ayant les mêmes conditions environnementales (hébergement, nourriture etc...) pour chaque animal

Tester uniquement les « facteurs tumeurs » en recréant des lésions à partir de xénogreffes d'un clone unique de cellules tumorales pures, issues de culture *in vitro*

Pouvoir étudier de manière séquentielle, chronologique, à différents temps de sacrifice l'évolution métastatique, ce qui est impossible chez l'homme.

Ce projet d'expérimentation animale a donc pour but d'étudier via un modèle de xénogreffe murine, le mode de diffusion métastatique des ADCI comparativement aux ADNCI. La séquence d'apparition des lésions métastatiques et l'ordre chronologique d'atteinte secondaire seront étudiés. Les lignées cellulaires AGS (modèle cellulaire d'ADNCI) et KATO III (modèle cellulaire d'ADCI) seront utilisées. Le critère de jugement principal sera le taux d'atteinte carcinomateuse péritonéale. Les critères secondaires seront le degré d'envahissement local, ganglionnaire et au niveau des autres sites métastatiques.

Concernant la rédaction du protocole de recherche, il a été décidé de suivre les principes des règles ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments).

1052- 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 diagnostique. 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.

1053- La toux est un réflexe de défense respiratoire principalement déclenché à partir du larynx, de la trachée et des bronches proximales. Les stimuli à l'origine d'une toux sont variés et les afférences nerveuses participant à la régulation de la toux nombreuses. Dans certaines pathologies comme l'asthme, la toux est un symptôme très fréquemment rapporté semblant néanmoins être fortement influencé par des activités telles que l'exercice.

L'objectif de l'étude est de déterminer la sensibilité et l'intensité du réflexe de toux à l'exercice chez le lapin anesthésié et sensibilisé.

Pour répondre à cet objectif, un modèle animal a été développé (ayant déjà fait l'objet de plusieurs publications) autorisant d'une part une stimulation trachéale mécanique (durées : 50ms à 1000 ms) et d'autre part la réalisation d'un exercice par électrostimulation musculaire. Les lapins ont au préalable fait l'objet d'une sensibilisation par ovalbumine mimant ainsi un état inflammatoire bronchique semblable à celui rencontré dans la maladie asthmatique. Cette préparation nécessite donc une anesthésie générale et la réalisation d'une trachéotomie. L'enregistrement des

différentes variables ventilatoires (débit, volume, résistance) nécessaires à la caractérisation de la réponse (réflexe de toux, réflexe expiratoire, soupir) est réalisé en continu, la stimulation trachéale étant réalisée par l'intermédiaire d'un cathéter connecté à un moteur rotatif.

Un nombre de 20 lapins semble raisonnable afin de répondre aux objectifs.

Les résultats permettront une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la toux à l'effort chez des sujets porteurs d'une inflammation bronchique et hypothétiquement contribuer à améliorer la prise en charge du symptôme toux chez les sujets asthmatiques.

1054- Notre but est d'explorer, au niveau cellulaire et intégré, le mécanisme (s) qui contrôlent la répartition des nutriments. Nous allons étudier le dialogue cerveau – foie. La littérature a démontré que la suppression de neurones AgRP et la surexpression spécifique de ChREBP dans le foie conduisaient à des phénotypes qui partagent des similitudes frappantes. Dans les deux cas, l'expression de la protéine SCD1 est régulée à la hausse et la lipogenèse hépatique est pleinement engagée et associée à une amélioration du métabolisme du glucose sous régime riche en graisses. En outre, les souris surexprimant ChREBP affichent de faibles niveaux d'insuline à jeun, une masse du tissu adipeux faible et des concentrations d'acides gras non estérifiés réduits sous régime riche en graisses ce qui suggère que le signal du foie d'origine peut-être propagées aux tissus périphériques pour améliorer la dépense d'énergie et la sensibilité à l'insuline.

Notre hypothèse est que l'expression hépatique de ChREBP peut promouvoir un message du foie d'origine qui sera rapidement transmise au cerveau par le nerf vague. À son tour, l'intégration centrale de ce signal aura une incidence sur la lipogenèse dans les tissus adipeux et sur la libération d'insuline, par le pancréas, en augmentant le tonus sympathique, et ceci tout en améliorant la sensibilité à l'insuline dans le foie et dans les muscles squelettiques. En ce qui nous concerne, nous prévoyons que l'intégration des signaux du nerf vague, provenant du foie, par le cerveau aura une incidence sur l'utilisation des substrats, ainsi que sur la communication inter-organes à travers des mécanismes physiologique similaire à ceux apparaissant dans le modèle animal déplété en neurones AgRP.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen car nous regardons les dialogues neuronaux ainsi qu'inter-organes, et utilisera le minimum de souris nécessaire en respectant le plus possible le bien être animal (raffinement des procédures, anesthésie et analgésie ; et amélioration de leur environnement, nid végétal). Au cours de cette étude de 3 ans environs 576 souris (*mus musculus*) seront utilisées. Sur ces différents animaux nous allons effectuer différentes expérimentations permettant d'évaluer le métabolisme de ces modèles en cages métabolique (cages calorimétrique), ainsi que d'évaluer leur comportement et motivation (mur opérant, comportement alimentaire, préférence de place). A la fin des expériences la mise à mort des animaux se fait par dislocation cervicale.

1055- Il a été montré dans le laboratoire, chez l'Homme et dans un modèle murin, que les cellules souches (musculaires et hématopoïétiques) survivent à des périodes prolongées post-mortem dans les cadavres (jusqu'à 17 jours post-mortem) et qu'elles résistent à des conditions de cultures dépourvues d'oxygène, et ce sur plusieurs jours; contrairement à leurs cellules filles qui meurent dans ces conditions.

Partant de ce constat notre objectif est d'étudier le comportement des cellules cancéreuses provenant des leucémies en anoxie. Sachant d'ores et déjà que les cellules souches hématopoïétiques résistent à la culture en milieu anoxique, il serait intéressant de voir si les cellules leucémiques peuvent en faire de même. Si cela n'est pas le cas, cela constituerait une méthode simple, efficace et peu onéreuse pour purifier la moelle osseuse des cellules cancéreuses en la conditionnant en l'absence d'oxygène et en effectuant par la suite une autogreffe. Ce modèle permettra, en plus du potentiel thérapeutique de comprendre un peu mieux la biologie des cellules cancéreuses et de leur comportement.

1056- 1. Nous étudions la connectivité cortico-corticale dans le cortex du macaque *Cynomolgus* en utilisant des traceurs rétrogrades fluorescents et l'IRM de diffusion sur cerveau entier. Ceci nous permettra de construire une base de données hybride d'IRM de diffusion et de traçage de voies à haute densité. Notre base de données existante couvre les connexions de 29 des 91 aires corticales du macaque. Au cours des cinq prochaines années nous allons étudier la connectivité de 25 à 40 aires corticales. Dans certains cas, nous serons en mesure d'utiliser deux traceurs distincts dans chaque cerveau. Nous allons utiliser 6 à 8 animaux par an, avec un maximum de 40 *Cynomolgus* et 5 Rhesus au cours de la période de cinq ans. Les IRM de diffusion seront effectuées sur les cerveaux post-mortem.

2. L'augmentation de la taille du cerveau entraîne à une réduction de la connectivité. Cependant, nous ne savons pas comment cela influe sur la force des connexions longues distances, qui sont importantes pour déterminer spécificité du réseau intracortical comme l'ont montré nos travaux précédents. Nous allons donc mesurer les propriétés du réseau cortical avec des cerveaux de différentes tailles. Afin que l'ordre de l'animal ne soit un facteur de confusion, nous examinerons la connectivité chez un petit et un grand rongeur (souris et capybara) et chez un petit et grand primate (*microcebus* et babouin).

1057- La thrombose est une cause sous-jacente de nombreuses maladies cardiovasculaires, et la génération de thrombus dans la circulation artérielle peut entraîner un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral ischémique (AVC).

Les anticoagulants traditionnels (héparine non fractionnée, héparine de faible poids moléculaire, ...) et les antiagrégants plaquettaires (aspirine, clopidogrel, ...) sont généralement utilisés pour ces indications. Les limites de leur utilisation sont la variabilité de leurs profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, leur incapacité à

inhiber la thrombine liée à la fibrine, le risque de thrombopénie induite par l'héparine, les interactions médicamenteuses et les saignements.

Dans cette étude, nous nous proposons d'évaluer les effets anticoagulants d'un nouvel agent antithrombotique, l'otamixaban, dans un modèle expérimental d'occlusion coronaire aiguë. L'espèce animale choisie pour notre étude est le porc de taille réduite (lignée FBM) qui présente une hypercholestérolémie qui se traduit par une dysfonction endothéliale aboutissant à la formation de plaques d'athérosclérose de type humaine.

De plus, de façon générale, le porc possède une physiologie coronaire et cardiaque très semblable à l'homme.

Pour cette étude, 40 porcs adultes seront randomisés en 5 groupes de 8 animaux.

L'animal étant placé sous anesthésie générale, nous induirons une occlusion coronaire pendant 1 h30 ; selon le groupe dans lequel cet animal sera randomisé, le traitement par la molécule à tester sera appliqué puis l'occlusion coronaire sera levée pour permettre une reperfusion totale du vaisseau pendant 4h. Puis l'animal sera sacrifié et son cœur explanté afin de réaliser des analyses histologiques sur la zone de nécrose générée par l'occlusion coronaire, pour comparer la taille de sa surface selon les traitements appliqués.

Nous considérons que 8 animaux par groupe est le nombre minimum d'animaux à inclure pour obtenir des résultats qui seront statistiquement exploitables. Afin de réduire au maximum les variabilités inter individuelles dans chaque groupe, nous prévoyons d'utiliser des animaux homogènes en âge et en poids (porcs adultes de 8 à 12 mois, 35-40 kg), présentant une physiologie comparable (taille des vaisseaux, état biologique, etc. ...). La rédaction détaillée étape par étape de notre protocole expérimental nous permet d'envisager l'obtention de résultats concluants qui éviteront des études complémentaires ultérieures.

L'évaluation de l'activité anticoagulante d'une molécule active ne peut être réalisée que sur l'animal vivant afin d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, et en particulier pour étudier les effets bénéfiques, voire adverses sur l'ensemble de l'organisme. Le développement pré clinique doit permettre d'évaluer dans un système non humain l'activité de ce candidat médicament. Pour garantir la sécurité des personnes, la loi et l'éthique exigent qu'il soit testé sur un modèle animal approprié avant que les essais cliniques chez l'homme puissent être réalisés.

Notre étude sur un modèle animal de grande taille et proche de l'homme (porc) dans lequel nous avons induit une pathologie similaire à celle retrouvée chez l'homme fournira les données concernant l'efficacité anticoagulante de l'Oramixaban dans l'occlusion coronaire aiguë.

1058- L'estimation du coût énergétique des activités physiques doit être réalisée selon le type, l'intensité et la durée des exercices réalisés. En effet ce coût peut varier dans de très larges proportions en fonction des caractéristiques de la discipline. Dans le cadre du projet de thèse « Etude de la dépense énergétique (DE) chez le cheval trotteur à l'exercice » nous avons réalisé une enquête de terrain en 2012 sur les pratiques courantes d'entraînement du cheval trotteur. Nous voulons maintenant quantifier la DE induite par les différents exercices identifiés afin d'en déduire une dépense énergétique quotidienne et hebdomadaire moyenne chez les chevaux trotteurs.

La quantification de la DE sera réalisée chez six trotteurs expérimentaux par la mesure de la consommation d'oxygène (VO₂) et traduite en kilocalories grâce à l'équivalent calorique d'un litre d'oxygène. Grâce à un appareil portable de mesure des échanges respiratoires, utilisé en routine dans l'entraînement d'athlètes humains, les chevaux réaliseront les exercices tests équipés d'un masque facial et d'un analyseur portable.

1059- Les objectifs généraux de ces procédures sont d'étudier

(i) les principaux facteurs de variation de la dépense énergétique du chien et du chat, notamment en fonction de leur composition corporelle et donc de leur embonpoint,

(ii) les variations concomitantes de sensibilité à l'insuline dont la baisse est à l'origine de multiples désordres métaboliques en général considérés comme secondaires à l'embonpoint et

(iii) certains facteurs de variation de l'utilisation de l'énergie des rations, principalement au niveau digestif, dans la mesure où l'on est continuellement à la recherche de formules de haute qualité nutritionnelle et "environnementale" sans toutefois que cela expose les animaux à des risques de surconsommation d'énergie avec ses conséquences délétères que cela implique.

Pour poursuivre ces objectifs, nous sommes susceptibles de mettre en œuvre de manière récurrente, sur les animaux, chiens et chats, de notre animalerie cinq procédures, résumées ci-dessous et décrites en détail au chapitre 4.

1. Détermination de la composition corporelle par dilution d'eau deutérée (2H₂O)

L'objectif est de déterminer la composition corporelle qui est en effet un élément déterminant de la dépense énergétique. La procédure consiste en deux prélèvements de sang, l'un basal, l'autre 2 ou 4 heures après injection d'une dose d'eau deutérée (au maximum 500 mg/kg).

2. Détermination de la sensibilité à l'Insuline par la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique

Cette méthode est la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité à l'insuline pendant quatre heures, les animaux sont équipés de deux cathéters permettant la perfusion d'insuline et de glucose, d'une part, et des prélèvements de sang, d'autre part

3. Détermination de la dépense énergétique au repos par la méthode des échanges respiratoires

La dépense énergétique est fortement corrélée à la production de dioxyde de carbone et au quotient respiratoire (CO₂ produit / O₂ consommé) qui indique la nature des substrats oxydés

Les animaux sont placés pendant au maximum 24 heures (détermination d'autant plus précise que la durée d'enregistrement est plus longue) dans une cage assujettie à un dispositif assurant la ventilation et la mesure de la concentration en gaz de l'air entrant (inspiré) et sortant (exhalé) de la cage.

1060- Nous voudrions, dans un but thérapeutique, tester de nouvelles molécules pouvant agir sur la croissance des tumeurs hypophysaires induites chez la souris.

Nous regarderons en même temps les effets de ces molécules sur les sécrétions hormonales de ces tumeurs. La ou les molécules actives pourraient être exploitées en thérapie humaine, pour pallier à l'absence de traitement efficace pour certaines formes de tumeur hypophysaire.

L'approche que nous mettrons en place utilisera des souris immunodéficientes afin d'éviter le problème de rejet. L'étude d'une molécule utilisera cinq souris par manipulation qui sera reproduite trois à quatre fois pour pouvoir valider les résultats obtenus. Chaque animal sera suivi tous les 2-3 jours pendant 21 jours. Ce type de protocole permet d'utiliser le même animal pour les différents temps de l'expérience. On réduit, ainsi, le nombre d'animaux utilisés.

1061- Les encéphalites chez l'homme présentent une incidence de 2 à 12 pour 100000 suivant l'âge des patients considérés et leur localisation géographique. Une fraction de ces encéphalites correspond à des cas de rage. Ils sont très souvent la conséquence d'une morsure de chien enragé et concernent principalement des enfants. L'OMS estime l'impact de la rage sur l'homme à au moins 50000 décès par an. Le laboratoire utilise des souris adultes ou âgées de 48 heures (génétiquement modifiées ou non selon les applications) pour l'isolement et le diagnostic des virus agents d'encéphalite et en particulier des lyssavirus (les agents responsables de la rage), pour des expériences concernant l'évaluation et la mise au point de nouvelles approches thérapeutique et vaccinale de la rage chez l'homme et enfin pour la compréhension des mécanismes liés à la virulence et la pathogénie des lyssavirus en lien avec leur capacité à franchir la barrière d'espèce et à infecter l'homme. Ces expériences viennent compléter des expérimentations effectuées sur culture cellulaire et représentent une étape incontournable pour l'avancement de la connaissance scientifique et non actuellement remplaçable par des tests *in vitro*. Ces tests sont soit basés sur des courbes de survie, sur la durée d'incubation et/ou sur la mesure de la prolifération dans l'organisme de l'agent infectieux. L'analyse des résultats utilise des tests statistiques permettant de comparer dans les règles de l'art les données qualitatives ou quantitatives obtenues et limitant le nombre d'animaux au strict nécessaire. Environ 150 animaux par an seront utilisés.

Isolement, et diagnostic des virus responsables d'encéphalite et notamment des lyssavirus, agents de la rage chez l'homme

L'isolement des virus fait de moins en moins appel à l'animal. Néanmoins il est parfois incontournable de procéder à l'utilisation de souris adultes ou mieux âgées de 48 heures lorsque des systèmes cellulaires alternatifs et susceptibles à l'infection n'existent pas ou seraient trop lourds à mettre en place dans un diagnostic de routine de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

Tests d'efficacité vaccinale et d'activité antivirale

D'une façon générale, ces tests sont réalisés pour tester l'efficacité immunogène ou l'efficacité antivirale d'une préparation. Ils commencent soit par une phase d'immunisation avec la préparation (avec ou sans adjuvant) ou soit par l'injection du composé chimique qui comporte une ou plusieurs injections de la préparation par différentes voies. Le test d'efficacité réalisé *in vivo* (injection par voie intramusculaire ou par voie intracérébrale de l'agent infectieux contre lequel la préparation est supposée protéger) fait suite et complète les résultats obtenus *in vitro*.

Evaluation de la pathogénie d'agents infectieux responsables d'encéphalite et de lyssavirus en particulier

Le contrôle de la rage dépend entre autres de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation des lyssavirus à de nouvelles niches écologiques. Le laboratoire dispose d'un catalogue d'isolats présentant naturellement des mutations et du savoir faire technique nécessaire à l'introduction de ces mutations dans d'autres isolats. L'expérimentation sur animaux permettra de relier la diversité génétique du virus avec les caractéristiques phénotypiques (pouvoir pathogène, diffusion dans l'organisme) de l'infection chez l'animal de laboratoire. La voie d'infection (injection par voie intramusculaire, intracérébrale ou intrapéritonéale) est choisie en fonction de la pertinence physiopathologique du modèle et des données existantes dans la littérature.

1062- Les canaux ioniques sont des protéines régulatrices de l'activité cellulaire qui constituent une cible privilégiée et majeure des médicaments actuels. Le développement de nouveaux médicaments impliquent de mieux comprendre la mise en place, les régulations et le fonctionnement de ces canaux, en particulier au niveau de l'organisme entier. Nous avons identifié une nouvelle classe de canaux ioniques, les canaux K2P. Ces canaux pourraient être impliqués dans des pathologies aussi diverses que l'épilepsie, les troubles de l'humeur, les arythmies cardiaques, l'hypertension et le cancer. Afin de comprendre les rôles physiologiques de ces canaux ioniques au niveau des organes et de l'organisme entier, nous avons inactivé chez la souris les gènes codant un certain nombre de ces canaux. Les effets de ces expériences au niveau cellulaire, des organes et de l'organisme de ces souris sont ensuite étudiés afin d'évaluer l'impact de la disparition du canal considéré sur le fonctionnement du cerveau, des organes sensoriels, du cœur et du rein. En l'absence de pharmacologie spécifique pour ces canaux, la conception de souris génétiquement modifiées est la seule approche non traumatique pour les animaux permettant d'aborder les

mécanismes physiologiques qui sont régulés par ces protéines au niveau de l'organisme. Les souris sont produites et développées dans notre laboratoire, puis étudiées en collaboration avec d'autres équipes de recherche en Europe, aux USA et au Japon. Cette demande a pour but de déclarer la reproduction et le maintien en nos locaux de 17 lignées différentes de souris génétiquement modifiées. Pour chaque lignée, 12 animaux seront maintenus en permanence (2 cages de reproduction et 2 cages contenant des adultes) afin de disposer d'animaux à envoyer à nos collaborateurs dans le cadre de projets qui feront l'objet de demandes d'autorisation distinctes

1063- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) représentent une sous-population de cellules dendritiques (DC) qui ont été initialement caractérisées par leur capacité à produire de fortes quantités d'IFN de type 1 suite à leur stimulation. Par la suite, il a été montré que ces cellules peuvent être directement impliquées dans l'induction de réponses immunitaires adaptatives ou d'une tolérance, chez l'homme et la souris. Il a été de plus récemment observé que ces cellules sont rapidement recrutées au niveau du tissu tumoral lors de développement de certains cancers humains.

Cependant le rôle de ces cellules au sein des tumeurs n'est pas défini. Les pDC pouvant participer aussi bien à l'induction de réponses immunitaires contre la tumeur qu'à la régulation de réponses immunitaires favorisant la croissance de celle-ci. Il est crucial de définir précisément leur rôle *in vivo* afin de déterminer si ces cellules doivent être ciblées lors de traitement anti-cancer.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier le rôle des pDC lors du développement de tumeurs en utilisant comme modèle chez la souris deux tumeurs différentes: un carcinome et un mélanome. Ces deux modèles murins nous permettront d'analyser le rôle de ces cellules dans un contexte physiologique et d'étudier tout particulièrement leur implication dans les interactions hôte-tumeurs, qui ne peuvent être abordées par des procédures alternatives *in vitro*. Pour cette étude, différentes lignées de souris seront utilisées, et tout particulièrement des souris déficientes en pDC, afin d'analyser le développement de ces tumeurs en présence ou en absence de pDC. Ceci nous permettra de déterminer si ces cellules sont directement ou indirectement impliquées dans le développement tumoral et d'en définir la fonction. Le rôle des pDC sur l'efficacité d'un traitement thérapeutique anticancer établi par le laboratoire sera aussi évalué. De plus, s'agissant de la mise en place de nouvelles thérapeutiques anti-cancers, seule l'utilisation de modèles animaux *in vivo* permet d'évaluer leur efficacité nécessitant obligatoirement le recours à un modèle animal. Le fait que les fonctionnalités des pDC murines et humaines soient très similaires justifie pleinement l'utilisation de souris pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance des tumeurs humaines.

Approximativement 1000 animaux par an seront utilisés pour répondre aux questions de ce projet. Ce nombre est adapté pour atteindre l'objectif du projet avec des résultats statistiquement acceptables permettant d'apporter des réponses définitives aux questions posées dans ce projet. Le nombre élevé de souris nécessaire à ce projet est du également au fait que cette population cellulaire est faiblement représentée. Ainsi, l'analyse fonctionnelle des pDC lors de développement de tumeurs nécessitera de sacrifier un grand nombre de souris afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules permettant de réaliser des études fonctionnelles sur cette population avec des résultats statistiquement fiables.

Les protocoles sont établis afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées et en définissant des points limites les plus précoces possibles. D'autre part, la surveillance régulière des animaux permettra de détecter rapidement si l'état de santé général des souris se détériore. En cas d'anomalie, les animaux seront mis à mort afin d'éviter toute souffrance.

L'ensemble des résultats de ce projet permettra d'apporter des informations essentielles pour le développement de traitements des cancers chez l'homme.

1064- Chez l'humain, l'endoscopie est une technique diagnostique non invasive permettant d'examiner la muqueuse digestive de façon répétée à la recherche d'inflammation ou de processus tumoral.

Dans le cadre de la recherche médicale, il existe plusieurs modèles animaux pour l'exploration du système immunitaire, de l'inflammation et de la cancérogénèse au niveau du tube digestif.

Ces modèles sont validés pour tester de nouvelles thérapies. Dans le passé, les souris devaient être sacrifiées afin d'analyser l'activité de la maladie et le développement tumoral. Depuis quelques années, des équipes ont développé la coloscopie chez la souris afin de permettre un suivi régulier et éviter le sacrifice de l'animal.

1) La préparation colique est un critère de qualité en particulier dans les endoscopies diagnostiques. Le but de cette étude est de comparer trois types de préparation colique: Polyéthylène glycol, préparation rétrograde, absence de préparation. La qualité de la préparation sera évaluée selon le « Baron Bowel Scale Preparation» qui fait référence.

2) Afin de permettre une reproductibilité dans les modèles de colites induites (sulfate de dextran sodique (DSS) ...), il y a nécessité de créer un score d'activité endoscopique validé en intra- et inter- observateur. Actuellement un seul score composite non validé a été proposé, le MEiCS. Le but est de réaliser des enregistrements répétés tous les 3 jours chez des souris avec modèles DSS dès J7, jusqu'à obtention de la cicatrisation muqueuse.

Ce score ne contiendra que des items endoscopiques et s'appuiera sur l'UCEIS (Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity) validé récemment dans la rectocolite ulcérohémorragique.

1065- *Candida albicans* est une levure pathogène qui vit dans le tube digestif humain ainsi que dans la cavité vaginale. Le tube digestif est considéré comme le réservoir principal pour l'infection par *C. albicans* et il est admis que les candidémies et candidoses disséminées ont pour origine essentiellement le tube digestif. Ainsi la colonisation

excessive par *C. albicans* est associée à d'autres facteurs (déficit immunitaire, altération de la muqueuse digestive et de la flore intestinale suite à la prise d'antibiotiques et à de la radiothérapie) qui favorisent le passage de *C. albicans* à travers la barrière épithéliale digestive et les possibilités de dissémination dans la circulation sanguine et provoquent des infections disséminées graves. Ce sont les levures du genre *Candida* qui posent des problèmes médicaux parmi les plus importants, notamment en milieu hospitalier où elles se situent parmi les germes les plus redoutés de nombreux services hébergeant des patients à prise en charge lourde.

Selon les études, les *Candida* se situent au quatrième rang des agents infectieux responsables d'infections nosocomiales (infections contractées pendant le séjour du patient à l'hôpital). La mortalité des candidoses systémiques est estimée entre 10 et 40%, et leur morbidité entraîne des prolongations de séjours de plus en plus fréquentes et le coût des antifongiques dont la plupart sont prescrits à visée empirique ou prophylactique croît de manière exponentielle. Notre équipe s'intéresse au rôle de *C. albicans* dans l'aggravation de la maladie de Crohn (MC). En effet, notre équipe a pu successivement démontrer que i) les patients atteints de la MC ont un taux élevé d'anticorps anti-levures ii) le nombre de ces anticorps et leur amplitude sont corrélés avec la sévérité de la MC, iii) la colonisation digestive accrue par *C. albicans* chez les patients atteints de la MC et leur parents sains du premier degré. Il était important de compléter ces recherches par un volet expérimental afin d'approfondir nos connaissances sur les processus inflammatoires liés à la colonisation/infection par *C. albicans*. Pour cela, nous avons développé un nouveau modèle de colonisation par *C. albicans* chez des souris ayant subi un traitement au sulfate de dextran sodique (DSS) afin d'induire une pré-inflammation du côlon. Ce modèle de DSS mime parfaitement la maladie rectocolite hémorragique chez l'Homme. Dans ce modèle, nous allons utiliser des souris invalidées pour les gènes des récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent les motifs de la paroi de *C. albicans* comme la mannose binding lectine (MBL). Ces études nous permettront de mettre en évidence les gènes associés aux susceptibilités liées à la colonisation/infection par *C. albicans*.

1066- La plupart des malades ayant des métastases hépatiques d'origine colorectales sont traités par des chimiothérapies systémiques associant du 5 FU, de l'irinotécan et de l'oxaliplatine. Ainsi, les protocoles de chimiothérapie les plus utilisés sont: le FOLFOX et le FOLFIRI et plus rarement le FOLFIRINOX, ils sont respectivement le résultat de l'association de 5FU et de l'oxaliplatine; du 5FU et de l'irinotécan; et du 5FU, irinotécan et oxaliplatine. Le but de ces chimiothérapies est multiple: Soit encadrer le geste chirurgical soit réduire la masse tumorale précédant une éventuelle chirurgie. Il est aujourd'hui bien démontré que ces drogues peuvent induire des lésions histologiques du parenchyme hépatique. D'une façon schématique et en individuel, le 5FU est à l'origine de stéatose, l'irinotécan de stéato-hépatite et l'oxaliplatine d'une atteinte vasculaire consistant en une dilatation sinusoïdale associée à une hémorragie.

La plupart des études ont été réalisées par des équipes chirurgicales et elles se sont surtout intéressées à l'impact de la toxicité des chimiothérapies lors du geste chirurgical. Il est clairement démontré aujourd'hui que les lésions chimio-induites augmentent la morbidité opératoire des hépatectomies majeures et peut-être dans certains cas la mortalité. Mais il n'existe pas à ce jour de modèle animal performant, pouvant reproduire ces lésions, par ailleurs, très peu d'études ont déterminées de façon précise l'impact de ces traitements lorsqu'ils sont utilisés en association.

Par ailleurs, certaines molécules semblent présenter un rôle protecteur du parenchyme hépatique quand elles sont administrées de façon conjointe avec des chimiothérapies. L'acide ursodésoxycholique « AUDC » pourrait apporter une protection contre la toxicité des chimiothérapies. De même, la vitamine E présente des propriétés antioxydantes qui pourraient s'avérer bénéfique lors de traitement par chimiothérapie.

Le but de cette étude est d'évaluer la toxicité hépatique de ces traitements en reproduisant un modèle animal de toxicité hépatique, mais également d'évaluer l'effet bénéfique de l'acide ursodésoxycholique associé ou non à la vitamine E au cours de ces traitements.

1067- Le laboratoire dispose de plusieurs appareils d'imagerie dédiés au petit animal.

Différents protocoles de recherche utilisant ces outils sont envisagés.

- Imagerie μ CT: dans le but d'améliorer la qualité des images réalisées sur l'animal, nous allons tester différents produits de contraste afin de pouvoir définir avec précision la molécule mais aussi la dose injectée et la fenêtre temporelle permettant d'obtenir la meilleure image répondant à la question posée.

- Bioluminescence / fluorescence: évaluer différentes sondes d'intérêt dans le suivi longitudinal de croissance tumoral chez la souris.

- Imagerie μ SPECT : sélection de molécules couplées à un traceur radioactif pour le suivi du développement tumoral et/ou le développement de métastases.

L'étude sera réalisée sur des souris à raison de 60 souris/an soit 180 souris au total.

1068- i) Le collagène de type 1 est la protéine constitutive majeure du tissu osseux. Elle est utilisée dans la composition des biomatériaux pour la reconstruction des altérations osseuses. D'autre part, ingérée sous forme hydrolysée cette protéine est une candidate nutritionnelle potentielle pour prévenir la perte de masse osseuse liée à l'âge. En effet, des travaux précédents ont mis en évidence certains effets bénéfiques du collagène hydrolysé (CH) dans un modèle de perte osseuse par carence hormonale.

ii) L'objectif de cette expérimentation est de récupérer le sérum de souris enrichi en collagène hydrolysé. Ce sérum sera utilisé, par la suite, sur des cultures cellulaires de cellules osseuses pour étudier les fonctions "signal" des peptides de collagène.

1069- Nous souhaitons évaluer les potentiels thérapeutiques de l'administration d'un inducteur d'HO-1 par voie intradermique dans le cadre de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). Une étude préliminaire de ce traitement a été réalisé dans le cadre du diabète de type 1. Les résultats de cette étude ont mis en évidence une inhibition de l'attaque des lymphocytes T CD8+ contre le pancréas. L'utilisation du modèle EAE nous permettra de savoir si un tel traitement s'avère efficace dans d'autres pathologies autoimmunes présentant un contexte physiopathologique différent. En effet, l'EAE est majoritairement dépendante des lymphocytes T CD4+, ce qui nous permettra d'évaluer l'impact de notre traitement sur cette population cellulaire en particulier.

1070- L'interleukine 22 (IL-22) est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-10. Elle est uniquement produite par des cellules hématopoïétiques, plus particulièrement par les lymphocytes T et certaines cellules appartenant à la famille des cellules lymphoïdes innées. Ses cibles cellulaires sont en revanche exclusivement représentées par des cellules épithéliales, les hépatocytes et les cellules acineuses du pancréas. L'IL-22 joue donc un rôle majeur dans les communications entre systèmes immunitaire et épithéliaux.

Les propriétés biologiques de cette cytokine sont encore imparfaitement comprises et semblent par ailleurs être extrêmement dépendantes du contexte dans lequel elle est produite. Ainsi, l'IL-22 exerce des actions protectrices importantes, démontrées dans des modèles d'infections digestives et pulmonaires à entérobactéries, des modèles d'hépatites chimiques ou encore de fibrose pulmonaire et de colites inflammatoires.

1071- L'inflammation chronique est maintenant très largement reconnue comme étant responsable du déclenchement de nombreuses maladies allant des maladies cardiovasculaires aux maladies du système nerveux en passant par le cancer. De plus, la réponse inflammatoire est responsable de la résistance à la chimiothérapie.

Les inflammasomes sont des complexe multiprotéiques présents dans le cytoplasme des cellules du système immunitaire et éventuellement présents dans d'autres types cellulaires. C'est suite à l'assemblage de ces complexes que des caspases (enzymes clivant les protéines possédant des Cystéines) sont recrutées et activées. Suite à leur activation, elle vont couper des précurseurs de cytokines inflammatoires pour les rendre actif, ce qui entraîne l'inflammation.

Les inflammasomes se structurent à partir d'une protéine adaptatrice nommée ASC. Cette dernière recrute des protéines NLR ainsi que des Caspases.

De manière à mieux comprendre le rôle de ces différentes protéines dans le déclenchement des maladies ainsi que dans la réponse aux traitements éventuels, il est nécessaire d'expérimenter sur des animaux de manière à savoir au niveau des organes touchés par la maladie s'il existe des variations de l'expression de ces protéines ou de leur activation. De plus, nous disposons de souris transgéniques Knock-out pour ces différentes protéines permettant de valider l'implication de ces gènes dans les phénomènes observés. 1800 souris au maximum seront utilisées durant les 5 prochaines années.

1072- Un laboratoire américain a généré des souris invalidées pour le gène FEV et montré que ces souris devenaient agressives et anxieuses suite à une diminution du nombre de récepteurs à la sérotonine au niveau du raphé. La sérotonine est impliquée dans le développement et la plasticité du cerveau. Ayant développé une lignée identique de souris, nous recherchons à mettre en évidence leur caractère anxieux grâce à des tests de.

Si le caractère anxieux et dépressif de ces souris est démontré, nous nous proposons d'étudier l'existence possible entre le développement tumoral et les niveaux de sérotonine. Nous réaliserons des cohortes de souris invalidées pour le gène FEV ; nous les traiterons par des inhibiteurs de recapture de la sérotonine, ensuite nous grefferons des tumeurs hormonodépendantes (MTX sein, prostate) ou insensibles (mélanome B16) que nous traiterons par deux doses non optimales de cis-Pt (6 et 4 mg/kg i.p dans un intervalle de 7 jours). Nous enregistrerons la variation de poids et la croissance de la tumeur des souris invalidées pour le gène FEV en la comparant à celle des souris témoins.

1073- Les cellules NK sont des lymphocytes du système immunitaire inné. Ils interviennent particulièrement dans la lutte contre les infections virales et les tumeurs. Notre laboratoire étudie les mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui régissent leur développement, leur survie et leurs fonctions, notamment dans l'optique d'identifier des moyens de les 'manipuler' et de les utiliser en immunothérapie. Le présent projet a pour but d'étudier le rôle d'acteurs moléculaires intrinsèques candidats dans la biologie des cellules NK. Pour cela nous utiliserons différentes souches de souris génétiquement modifiées pour exprimer des formes mutantes et/ou non-fonctionnelles de ces protéines candidates. Les expérimentations liées à ce projet seront menées sur la souris. En effet, ce modèle animal est le seul à l'heure actuelle permettant d'étudier une réponse immunitaire dans sa globalité étant donné les nombreuses interactions cellulaires et moléculaires nécessaires à sa mise en œuvre. Ce projet s'attachera à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés mais permettant de maintenir la robustesse statistique nécessaire à la production de résultats fiables et concluants.

1074- La lactation est la phase finale du cycle de reproduction des mammifères. Le lait est produit par la glande mammaire qui se met en place pendant la gestation et disparaît durant le tarissement. La production laitière (PL) au cours d'un cycle de la lactation est décrite par une courbe dont les caractéristiques sont le pic de lactation (maximum de PL) et la persistance de lactation qui exprime la capacité de la glande à maintenir un niveau de PL constant après le pic. Dans le contexte actuel, la recherche d'une meilleure persistance de la lactation est un enjeu intéressant pour tous les acteurs de la filière laitière, aussi bien producteurs (méthodes d'élevage et baisse des coûts de production) que transformateurs (régularité de l'approvisionnement). Pendant la gestation et au cours d'un cycle de lactation, la glande mammaire est soumise à des changements morphologiques, cellulaires et moléculaires très intenses. Ces phases critiques sont caractérisées par des contrôles hormonaux stricts modulant la réceptivité, la prolifération et la mort des différents types cellulaires mais aussi le remodelage tissulaire de la glande. La glande mammaire est un organe dynamique et complexe composé de nombreux types cellulaires intégrés dans un microenvironnement matriciel qui joue un rôle prépondérant dans les communications autocrines et paracrines. La caractérisation de cette plasticité cellulaire au niveau de la glande mammaire et la compréhension des contrôles endocriniens la contrôlant pendant la lactation doit permettre de moduler la persistance de la lactation.

Pendant la lactation, les différentes populations cellulaires présentes dans la glande mammaire évoluent phénotypiquement et quantitativement et ces phénomènes semblent être modulés par le statut hormonal de l'animal. La question abordée au cours de cette étude sera : Comment varie le phénotype des différents types cellulaires présents au sein de la glande mammaire au cours de la lactation? Elle concernera 5 vaches laitières primipares, sur lesquelles du tissu mammaire sera prélevé à 4 moments au cours d'un cycle de lactation. Il existe bien des lignées de cellules mammaires bovines, mais leur phénotype a dérivé dans le temps (et selon les laboratoires dans lesquels elles sont cultivées) et rend donc nécessaire notre essai in vivo. Ce dernier pourra nous permettre de créer nos propres lignées pour des études ultérieures.

1075- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la première cause de morbidité et la deuxième cause de mortalité chez l'homme dans les pays industrialisés. Le tribut à payer à cette pathologie reste très lourd : 10 à 12 % de l'ensemble des décès après 65 ans ainsi que des séquelles physiques, cognitives ou psychologiques chez plus de la moitié des victimes. En conséquence, le retentissement socio-économique des AVC est très important (1.2 milliards d'Euro par an en France). La majorité (80 %) des AVC sont de type ischémique, causés par une occlusion artérielle. En dépit des efforts de recherche expérimentale et clinique déployés dans ce domaine et hormis la thrombolyse dont l'efficacité sur une grande échelle reste discutée, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de thérapeutique contre cette pathologie en clinique.

Durant les 30 dernières années, plusieurs modèles animaux ont été développés, essentiellement chez les rongeurs, pour étudier la physiopathologie et la thérapie de l'ischémie cérébrale. Un grand nombre d'interventions thérapeutiques contre l'ischémie cérébrale se sont ainsi montrées efficaces chez ces espèces. Cependant, chez l'homme, ces interventions se sont révélées sans effet bénéfique. Ainsi, des comités d'experts ont récemment recommandé l'utilisation de modèles animaux se rapprochant le plus possible de la clinique humaine, notamment en utilisant des animaux présentant des facteurs de co-morbidité et des espèces animales plus proches, phylogénétiquement, à l'Homme. Dans ce contexte, nous avons développé au laboratoire un modèle original d'ischémie cérébrale par voie intraluminale chez le marmouset (*Callithrix jacchus*) dans lequel nous souhaitons intégrer l'hypertension artérielle chronique (HTA). En effet, l'HTA demeure un sérieux problème de santé publique dans le monde. Bien que cette affection représente le premier facteur de risque et aggravant dans l'ischémie cérébrale, rare sont les études pré-cliniques qui intègrent ce facteur dans l'étude de la physiopathologie et du traitement de l'ischémie cérébrale. Ainsi, le développement d'un modèle d'ischémie cérébrale chez le primate non humain hypertendu permettra de se rapprocher des conditions de la pathologie rencontrée en clinique. Ce modèle servira également à analyser les effets de l'hypertension artérielle chronique sur la régulation de la microcirculation par les astrocytes. En effet, durant les dernières années, plusieurs études, basées sur l'utilisation de la microscopie biphotonique, ont montré que les astrocytes, cellules présentant de nombreux contacts avec les vaisseaux et les synapses neuronales, participent de façon majeure à la régulation du débit sanguin cérébral (DSC) en réponse à une activation neuronale. Comment l'hypertension artérielle chronique affecte les relations entre activation neuronale, activation astrocytaire et réponse vasculaire n'est pas bien connu, surtout chez le primate non humain. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 30 (18 pour les effets de l'HTA sur l'ischémie cérébrale et 12 pour les effets de l'HTA sur le couplage neuro-glio-vasculaire).

1076- L'objectif principal de ce projet est d'établir et de maintenir des élevages de tiques. Notre laboratoire dispose de 5 souches de tiques ; 4 espèces non infectées (*Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor marginatus*, *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*) et 1 espèce (*Rhipicephalus sanguineus*) infectée par *Rickettsia conorii* ; l'élevage de cette dernière espèce sera effectué au sein d'un laboratoire de niveau de sécurité microbiologique 3.

- La première étape consiste à raser les poils couvrant les oreilles du lapin (race New Zeland) jusqu'à la base. La peau des oreilles est ensuite désinfectée à l'alcool chirurgical.

Chaque oreille est couverte d'une chaussette en tissu fin puis d'une seconde chaussette en tissu épais. Ces chaussettes sont maintenues à la base par une bande adhésive type élastoplaste sans trop serrer afin de ne pas causer d'œdème.

Un collier en plastique (type carcan utilisé en chirurgie vétérinaire) est mis en place pour protéger le dispositif.

- La seconde étape consiste à introduire les tiques dans la chaussette puis fermer celle-ci. Le cycle biologique des tiques dures (Ixodidae) comprend trois stades successifs - larve / nymphe / adulte – chaque changement de stade nécessitant un repas sanguin.
 - Une fois les tiques gorgées et récupérées, le carcan et les chaussettes sont ôtées et les oreilles du lapin désinfectées à la bétadine.
- Un lapin est utilisé pour un cycle complet (larve/nymphe/adulte) soit 3 fois sur une durée d'environ un an. Un lapin est dédié à une espèce de tique non infectée.
- Pour l'élevage de tiques infectées avec *Rickettsia conorii*, on utilise un lapin par stade car on ne peut pas garder un lapin sur 1 an en laboratoire de niveau de sécurité microbiologique 3.

1077- Notre objectif est de fournir aux chirurgiens oncologues une technique innovante d'imagerie médicale, et d'aide à l'acte chirurgical en temps réel : l'immuno-photodétection (IPD) alliant la spécificité des anticorps monoclonaux anti-tumeur à la sensibilité de la détection par fluorescence. Cette technique sécurisera l'exérèse de tumeurs de taille infraclinique invisibles à l'œil nu (< 10 mg pour un chirurgien très bien entraîné) lors de l'acte chirurgical. Le conjugué (anticorps couplé au fluorochrome) dirigé sélectivement vers les cellules tumorales est injecté au patient. 48 heures après, le chirurgien opère le patient et retire les nodules tumoraux visibles à l'œil nu. Il peut alors éclairer le champ opératoire avec la sonde optique choisie, et visualiser l'image de la fluorescence induite sur une interface vidéo. Les nodules de petite taille s'illuminent et peuvent être enlevés, diminuant ainsi directement le risque de rechute du patient.

Dans le cadre du développement d'un conjugué fluorescent ciblant les tumeurs, notre but est de préparer le dossier réglementaire pour la mise en place d'essais cliniques permettant de prouver la faisabilité de la technique d'IPD chez l'homme, et l'absence de toxicité de ce premier conjugué fluorescent.

Dans deux premières séries d'expériences (CEEA-LR-12012 et CEEA-LR-12062) nous avons pu déterminer la dose de conjugué idéale pour une expérience d'IPD sur une carcinose péritonéale induite par l'injection de 2 lignées cellulaires, mais également sur des tumeurs de cancer du sein en sous-cutané afin de visualiser les berges de résection. Les expériences de comparaison des sondes ont été concluantes et la production du conjugué en qualité GMP chez notre prestataire de service est en cours. Ce protocole constitue donc la suite de ces expériences et a pour but de présenter les expériences prévues pour terminer la caractérisation du conjugué dans de nouveaux types tumoraux (estomac et xénogreffe orthotopique), de confirmer les résultats obtenus sur le sein et de procéder à des tests préliminaires de toxicologie du conjugué ou du fluorochrome seul.

La totalité de ce projet nécessitera l'utilisation de 260 souris (*Mus musculus*).

1078- Les études de pharmacocinétique ont pour objectif d'apporter des informations critiques sur la biodisponibilité in vivo de nouveaux composés chimiques potentiellement intéressants en thérapeutique. Pour cela ils seront dosés dans des échantillons de sang ou dans des organes d'animaux ayant été traités par le produit. Cette information sur le devenir du composé dans l'organisme est cruciale pour les programmes de recherche en chimie médicinale, car seuls les produits qui atteignent leur cible biologique peuvent être actifs. Il s'agira donc d'une activité transversale qui permettra de sélectionner, pour un développement futur, les molécules auxquelles les animaux sont correctement exposés.

Nombre et type d'animaux : 24 souris (ou 8 rats) permettent d'étudier la pharmacocinétique d'un composé administré selon un schéma particulier. Ce nombre est à multiplier par le nombre de pharmacocinétiques envisagées. On peut faire une estimation de 840 souris et de 120 rats sur la période de 5 ans.

Conformité avec la règle des 3R

- réduire
 - o en se limitant aux expériences indispensables : ces études de pharmacocinétique ne se feront que pour un nombre restreint de composés choisis soigneusement à l'aide des informations préalables acquises in vitro. Nous tiendrons compte de leur efficacité pharmacologique (modèles vitro cellulaires et moléculaires), de l'absence d'éléments suggérant une toxicité, mais aussi de leurs propriétés physicochimiques et autres mesures prédictives de leur stabilité in vivo (stabilité dans des solutions mimant les fluides gastriques, en présence de microsomes hépatiques...) ou prédictive de leur capacité à être absorbés par l'intestin (modèle cellulaire Caco-2...).
 - o en utilisant le nombre minimal d'animaux par expérience de pharmacocinétique : Classiquement 24 souris (ou 8 rats) permettent d'obtenir des données solides et complètes, même en cas de perte d'une ou deux données individuelles, et d'éviter ainsi le renouvellement de l'expérience. Si compatible, des composés pourront être mélangés dans la même formulation pour obtenir 2 pharmacocinétiques avec une seule série d'animaux.
 - o des protocoles expérimentaux seront rédigés avant toute expérimentation. Les doses, voies, fréquence d'administration et cinétique de prélèvement de sang seront soigneusement choisies en fonction des caractéristiques connues du composé.
- raffiner
 - o par la pertinence du choix du modèle animal : nous travaillerons avec la même espèce (rat ou souris) que celle prévue pour l'évaluation de l'activité pharmacologique, et si possible avec la même souche, ainsi que le même sexe.
 - o par la planification des études pour garantir un hébergement optimal des animaux, la disponibilité des salles d'expérimentation...

- o La douleur infligée sera réduite au minimum : Les composés étudiés n'auront pas montré d'effet toxique dans des modèles vitro. La méthode de dosage du composé sera optimisée afin de réduire les volumes de sang à prélever, dans le but de privilégier les prélèvements les moins agressifs. En cas de signes cliniques montrant une douleur autre que minime et momentanée, le protocole sera abandonné.
- remplacer
- o nous exploiterons des modèles vitro et silico pour prédire les propriétés ADME des molécules chimiques et limiter ainsi l'expérimentation animale aux composés ayant un profil favorable.

1079- La maîtrise des fonctions de reproduction est une composante essentielle de l'élevage moderne en termes de rentabilité et d'une meilleure gestion de l'espace rural. Les travaux de recherches que nous développons sont basés sur l'exploitation de la variabilité génétique de la prolificité (nombre de petits par portée) et les races ovines nous procurent des modèles d'études tout à fait intéressants. Ainsi, nos recherches sur les mécanismes de contrôle du nombre d'ovulations s'appuyant sur ces races ovines, nous ont déjà permis de mettre en évidence 6 mutations naturelles dans 3 gènes différents. D'une part, ces découvertes permettent de faire avancer nos connaissances scientifiques sur le fonctionnement de ces gènes et le contrôle biologique de la fonction ovarienne avec des retombées en clinique humaine. D'autre part, le génotypage de ces mutations dans les populations ovines permet une gestion raisonnée de la reproduction et donc la rentabilité d'un troupeau. L'observation in vivo des effets de ces mutations sur les mécanismes de la reproduction est donc incontournable et le remplacement par une autre espèce ou une méthode alternative ne peut être envisagé. En effet ces mutations sont apparues naturellement uniquement dans certaines races de brebis.

La présente demande d'autorisation de projet expérimental concerne la caractérisation de nouvelles mutations contrôlant la prolificité dans les races ovines Lacaune, Grivette, Noire-du-Velay et Ile-de-France. Ce projet concerne 200 brebis de races différentes pour ces expérimentations. Les effectifs d'animaux nécessaires ont été raisonnés en fonction des objectifs de chaque procédure expérimentale. Ils résultent d'analyses statistiques cherchant le nombre d'animaux minimum pour mettre en évidence les différences attendues de façon significatives. Pour pouvoir détecter ces mutations et comprendre leur fonctionnement, il est nécessaire d'expérimenter sur ces 200 animaux particuliers pour localiser les mutations dans leur génome (nécessiter de collecter du sang pour les analyses d'ADN), et caractériser leurs impacts sur la fonction de reproduction (endoscopie intra-abdominale pour le nombre d'ovulations). A l'issue de ces premières observations, 96 animaux extrêmes (parmi les 200) feront l'objet d'une procédure de prises de sang sériées et enfin, en fonction des résultats, 12 de ces animaux seront choisis pour la dernière procédure de laparoscopie sans réveil en vue d'analyses hormonales, avec euthanasie en fin de projet pour collecter des organes de l'axe reproducteur. La notion de raffinement, de point limite et de prise en charge de la douleur à fait l'objet d'une concertation appropriée et, est détaillée pour chacune des procédures.

1080- Le cancer de la prostate est le cancer le plus répandu chez l'homme, et est largement traité par radiothérapie externe. Cependant, le taux de rechute pour les cancers les plus avancés atteint environ 50%. Un des facteurs qui limiterait l'effet de la radiothérapie est l'hypoxie (insuffisance en oxygène au niveau de la tumeur). Cette hypoxie provient d'une architecture anormale des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. Or, nous avons observé récemment que la radiothérapie induit une meilleure perfusion vasculaire, et donc réduit l'hypoxie, ce qui a potentiellement des répercussions sur le pronostic clinique. Il est notamment important de déterminer si la radiothérapie permettrait une meilleure diffusion (et donc efficacité) d'agents de chimiothérapie. Pour cela, des tumeurs sont générées ensuite traitées par radiothérapie. En cours et après radiothérapie, 1) un marqueur de l'hypoxie potentiellement utilisable en clinique est utilisé pour évaluer la faisabilité chez l'homme, 2) les tumeurs sont prélevées (sur animaux euthanasiés) et analysées pour vérifier la distribution d'une chimiothérapie par microscopie; ou 3) les tumeurs sont laissées et leur croissance est suivie afin d'évaluer la guérison. Afin d'établir les groupes d'expérience et contrôles, un nombre total de 58 souris nude (NMRInu) est estimé.

1081- La schizophrénie tout comme la maladie d'Alzheimer sont des maladies psychiatriques, d'évolution chronique, ayant comme signes cliniques des troubles cognitifs importants tels que des altérations de la perception de la réalité et du temps, mais également des dysfonctionnements sociaux et comportementaux. Ces désordres multifactoriels peuvent être associés à de multiples gènes à risque qui peuvent agir en conjonction avec les processus environnementaux.

A partir d'outils électrophysiologiques, notre objectif est d'analyser finement d'un point de vue fondamental, chez le rongeur éveillé et libre de ses mouvements, l'interaction et la communication, au niveau cellulaire mais aussi à un niveau plus intégré, entre différentes dynamiques spatio-temporelles :

- i. Celle des patrons de décharges de circuits neuronaux corticaux et dopaminergiques.
- ii. Celle des activités électriques engendrées et véhiculées entre des structures cérébrales impliquées dans des oscillations électroencéphalographiques (EEG), lesquelles sont associées à divers états de conscience, physiologiques et pathologiques.

Ces études seront étudiées en fonction de l'âge chez les souris C57BL/6 (300 animaux sur 5 ans) et des rats de lignée wistar et Sprague-Dawley (260 animaux sur 5 ans). Plus précisément : i) chez des rats dont l'hippocampe ventral a été lésé par de l'acétate de méthylazoxyméthanol au cours du développement embryonnaire (rats MAM), ii) chez des souris génétiquement modifiées surexprimant une mutation humaine de la préséniline (PS1) à l'origine de forme

familiales rare et précoce de maladies d'Alzheimer chez l'Homme iii) chez des souris possédant une forme de polymorphisme modifiant le nombre de copies de certaines séquences génomiques, synthèse de la micro délétion d'ADN (acide désoxyribonucléique) chez l'homme (de 1.5 à 3.5 mégabases) sur le chromosome 22q11.2 et ayant une prévalence de 1/4000-4500 naissance. Cette micro délétion localisée multiplie environ par 20 le risque de devenir schizophrène.

Nous procéderons à l'analyse spectrale des EEG du cortex préfrontal et du cortex hippocampique (Transformée de Fourier : FFT), à l'évaluation statistique du degré de linéarité de leurs relations chronologiques (Fonction de cohérence), à la détection et la classification des activités de neurones de l'aire tegmentale ventrale (Noyau dopaminergique) et du lien temporel avec les champs de potentiels électriques locaux dans plusieurs séries de test comportementaux tels que l'open-field et le labyrinthe en T.

1082- Les odeurs jouent un rôle majeur dans la relation mère-jeunes dès la naissance, voire avant la naissance. La connaissance de leur nature ainsi que de leur mode de fonctionnement est essentielle pour permettre de favoriser et d'optimiser cette relation, par exemple pour les espèces d'élevages. Elle est également directement utile à notre propre espèce (optimisation du bien être du nouveau-né, né à terme ou prématuré).

Le présent projet porte sur une espèce modèle de grand intérêt sur le plan olfactif, le lapin. Chez cette dernière, le lapereau répond dès la naissance à des odeurs émises par la mère qui l'aident à s'orienter vers elle et plus précisément à localiser efficacement les tétines et à téter. Parmi ces odeurs, une molécule présente dans le lait agit comme une phéromone: la phéromone mammaire (PM). La PM est un outil exceptionnel d'investigation car elle déclenche de façon très efficace (et clairement observable et quantifiable) le comportement de tétée du lapereau. Elle n'est jamais perçue seule, mais au milieu d'autres odorants présents avec elle dans le lait ou sur le corps de la lapine. Elle permet d'ailleurs au nouveau-né, de façon remarquable, d'apprendre très rapidement de nouvelles odeurs, initialement sans signification pour lui. Alors que nous étudions la PM et le modèle lapin sous différents angles depuis plusieurs années (fréquence d'interaction, isolement et rôle de la PM au cours du développement, modulation par l'état prandial, mémoire engendrée par son action facilitatrice d'apprentissages...), notre objectif ici est de mieux cerner la perception que le jeune animal a de ce signal biologique hautement signifiant ou d'odorants appris par association avec lui et présents en mélanges. Pour cela, nous nous positionnons à deux niveaux de traitements de l'information olfactive: au niveau de la cavité nasale (muqueuse olfactive) et au niveau du cerveau. Dans tous les cas, un lien direct est fait avec le comportement exprimé par le nouveau-né, mesure qui nous permet systématiquement de nous assurer du traitement efficace, ou non, de l'information analysée.

La mesure du comportement de tétée est brève et clairement interprétable (réponse oui/non exprimée au cours d'une présentation de 10 secondes d'un stimulus). Elle permet d'obtenir des résultats statistiquement tranchés avec des petits effectifs d'animaux (15-20 lapereaux/groupes). Le test étant bref, l'animal est rapidement remis dans le nid, sans stress lié à la séparation d'avec la mère puisque chez cette espèce la femelle ne vient au contact de ses jeunes qu'une brève (5 minutes) et unique fois par jour.

Les autres mesures envisagées sont invasives. Elles reposent sur des procédures déjà bien établies, décrites et réfléchies. Elles réclament des prélèvements de muqueuse olfactive et de tissus cérébraux. De fait, les animaux concernés doivent faire l'objet d'un sacrifice rapide et net. Dans ce cas, le nombre d'animaux utilisés est rigoureusement réduit au minimum en vue d'obtenir des effectifs finaux de 10-12 animaux maximums par lots, ce qui est suffisant pour interpréter de façon sereine les résultats.

Au total, le présent projet impliquera 390 animaux

1083- Les cytokines sont des messagers moléculaires indispensables assurant la bonne communication entre les cellules du système immunitaire. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication d'une surproduction de cytokines dans les maladies inflammatoires chroniques, comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde. Depuis quinze ans, les premiers traitements ciblés anti-cytokines ont été commercialisés. Il existe actuellement 13 anticorps monoclonaux sur le marché qui ciblent les cytokines majeures, telles que le TNF α , l'IL-13, l'IL-6R ou l'IL-23, impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques. Toutefois, ces traitements présentent plusieurs inconvénients tels que l'apparition d'effets secondaires, des coûts élevés (entre 10 à 15 k€/an/patient), mais surtout la non-réponse au traitement de certains patients et l'apparition de résistance. Un tiers des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, traités par des agents anti-TNF α , sont non-répondeurs aux traitements et un tiers deviennent résistants suite à l'induction d'anticorps anti traitement.

C'est pourquoi, il reste nécessaire d'élargir l'offre thérapeutique pour les maladies inflammatoires chroniques et de proposer de nouvelles stratégies d'inhibition des cytokines.

Notre projet a pour objectif de développer une stratégie alternative: l'immunisation active anti-cytokine. Celle-ci a pour but d'induire la production, par l'organisme même du patient, d'anticorps capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine produite en excès et donc d'en réduire ses effets délétères. Aujourd'hui, plusieurs équipes s'intéressent à cette méthode et les premiers essais cliniques utilisant des molécules entières de TNF α confirment à la fois l'innocuité et l'efficacité de cette stratégie. Compte tenu des inconvénients possibles liés à l'utilisation de cytokine entière comme immunogène, notre laboratoire développe l'immunisation active à partir de fragments de cytokine, appelés peptides. Ces peptides étant à la base non immunogène car appartenant au "Soi", ils sont couplés à une protéine porteuse étrangère, la KLH (Keyhole Limpter Hemocyanin). L'immunogénicité de ce complexe, c'est-à-dire sa capacité à induire la production d'anticorps anti-peptide mais aussi anti cytokine est évalué chez la souris.

L'effet protecteur des peptides couplés les plus immunogènes est ensuite évalué dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques, dans lesquels la cytokine ciblée est impliquée.

La première étape dans le processus de développement d'un médicament nécessite de démontrer l'efficacité du traitement dans un modèle animal mammifère proche de l'Homme, indispensable avant la transposition chez l'Homme. Cela permet notamment d'éliminer des traitements potentiellement toxiques. La souris est un modèle qui satisfait ses exigences. Les peptides sont choisis *in silico* et des tests *in vitro* sont effectués au préalable pour limiter le nombre d'animaux, mais, dans le cas de développement de médicaments, l'expérimentation animale est néanmoins nécessaire et n'a pas d'alternative.

Pour chaque cytokine ciblée, 10 peptides sont en moyenne synthétisés puis testés. Nous utilisons 6 souris par peptide plus un groupe contrôle de 6 souris commun à toute l'expérience soit 66 souris. Enfin pour la réalisation de modèles murins de maladies inflammatoires chroniques, le nombre de souris utilisés dépend du nombre de peptides couplés immunogènes identifiés, soit en moyenne d'après notre expérience, environ 2 à 3. Nous utilisons 10 souris par groupe plus 10 souris contrôles communes à toute l'expérience, soit 40 souris par modèle.

1084- Les contaminations à *Cronobacter* spp (anciennement dénommés *Enterobacter sakazakii* sont responsables d'infections graves intestinales entérocolite nécrosante, de la circulation sanguine (septicémie), ou du système nerveux central (méningite). Ces infections touchent principalement les nouveau-nés dont le système immunitaire est peu développé et sont fatales dans 50 à 80% des cas. L'origine alimentaire est, dans la plupart des cas, démontrée (préparations infantiles à base de lait) et expliquée par l'extrême résistance de ces bactéries aux conditions de dessiccation des produits. Le règlement européen 2073-2005, qui définit les critères microbiologiques applicables aux aliments, exige la recherche d'*Enterobacter sakazakii* dans les préparations en poudre pour nourrissons.

Dans ce contexte nous désirons développer un test de détection des *Cronobacter* spp dans les produits alimentaires, basé sur le principe des immuno-essais. Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigènes, nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, non disponibles commercialement. De nombreux essais d'immunisations réalisés depuis 2008, pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, ont montré la faisabilité de l'approche mais n'ont pas abouti faute d'une sensibilité suffisante. Les anticorps polyclonaux sont connus pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux. C'est dans ce contexte que les protocoles d'immunisation sont soumis pour approbation. Ils conduiront à l'obtention d'immunsérums qui, une fois purifiés, aboutiront aux anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux (10 lapins et 6 moutons), les immunogènes et les protocoles ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injection et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les animaux retenus devraient, en outre, permettre de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums étant considérés comme stock patrimoine dans notre société, c'est à dire sans date d'expiration.

1085- Nos projets sont principalement axés sur l'étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent le développement précoce des cellules gliales dans le système nerveux central embryonnaire des vertébrés. La compréhension de ces mécanismes dans le cerveau embryonnaire représente un enjeu majeur qui pourrait avoir un impact important dans le cadre de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, la découverte de la persistance de cellules gliales immatures dans le cerveau adulte des mammifères, en mettant en évidence la présence d'un réservoir de cellules capables de régénérer les tissus lésés, offre de nombreux espoirs basés sur la perspective de traitements visant à stimuler la réparation des lésions du système nerveux. Des études préalables réalisées sur un modèle de culture de tissus embryonnaires de poulet nous ont permis d'identifier deux enzymes sécrétées, appelées Sulf1 et Sulf2, dont la fonction est de réguler l'activité de différentes voies de signalisation impliquées dans la différenciation des cellules gliales à partir de cellules souches/progéniteurs neuraux. L'objectif du présent projet est d'élucider la fonction de ces enzymes chez la souris. Nous disposons de lignées mutantes pour chacun des gènes d'intérêt. Le projet proposé a pour objectif d'analyser le développement glial dans le cerveau et la moelle épinière à différents stades du développement embryonnaire à l'aide de marqueurs spécifiques des populations de cellules gliales. Les souris mutantes pour les gènes sulf étant viables, nous analyserons les conséquences de la perte de fonction de ces enzymes dans le cerveau adulte. En particulier, nos projets ont pour objectifs d'étudier la fonction de Sulf1 et Sulf2 dans la différenciation des cellules gliales mais également dans l'établissement et le maintien des progéniteurs gliaux adultes. Par ailleurs, des études réalisées chez le poulet et le poisson zèbre nous ont permis de montrer que l'expression de Sulf1 est limitée à un petit nombre de cellules gliales ce qui suggère l'existence d'une hétérogénéité dans la population de cellules gliales myélinisantes appelées oligodendrocytes. Cette diversité pourrait suggérer des fonctions différentielles pour les oligodendrocytes. Sulf1 représente ainsi un marqueur unique pour aborder la question de la diversité des oligodendrocytes dans le cerveau adulte. Notre projet est de développer une étude de lignage chez la souris afin de caractériser la progénie des cellules Sulf1 dans le système nerveux central adulte. Cette étude sera réalisée à partir de souris Sulf1-Cre (lignée knock-in générée en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris) qui seront croisées avec des lignées reportrice Rosa-EYFP et Rosa-LacZ.

Dans son ensemble, ce projet est basé sur l'utilisation de 5 lignées murines distinctes (2 lignées knock-out, 1 lignée knock-in, 2 lignées transgéniques). L'étude des phénotypes de perte de fonction des protéines Sulfs sera réalisée à 3 stades du développement embryonnaire et chez le jeune adulte (stade d'induction des cellules gliales, de prolifération active de ces cellules et de différenciation terminale). Pour chaque stade, 3 individus sauvages et mutants seront analysés. L'étude de lignage sera réalisée chez le jeune adulte. De par la variabilité de l'activité de recombinaison de

l'enzyme Cre, l'analyse d'un plus grand nombre d'animaux sera nécessaire et nous estimons que 20 à 30 individus issus du croisement des souris Sulfl-Cre et ROSA seront nécessaires pour mener à terme ce projet.

1086- L'ischémie-reperfusion joue un rôle majeur dans les lésions rénales aiguës présentes en post-transplantation et dans la genèse d'une fibrose interstitielle secondaire. La compréhension des mécanismes contribuant à l'ischémie-reperfusion est par conséquent un objectif essentiel pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes contre la reprise retardée de fonction du greffon et la néphropathie chronique d'allogreffe. Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs) sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique, caractérisés par de multiples propriétés anti-inflammatoires et vasculo-protectrices. Plusieurs études ont démontré un rôle bénéfique des EETs dans des lésions d'ischémie-reperfusion cardiaque et cérébrale. Cependant, le rôle des EETs dans l'ischémie-reperfusion rénale reste méconnu.

La présente demande concerne la partie expérimentale d'un projet transversal étudiant l'impact de stratégies thérapeutiques de préservation des EETs sur les conséquences rénales et cardiovasculaires de l'ischémie-reperfusion rénale.

Ce travail expérimental s'attache à analyser des déterminants de la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion rénale in vivo et requiert donc, dans un premier temps, l'utilisation d'un modèle animal. L'étude de l'ischémie-reperfusion rénale bilatérale sur la souris C57/Bl6J est particulièrement bien validée. Pour ce travail, 180 souris mâles C57/Bl6J âgées de 10 semaines seront utilisées, nombre jugé nécessaire et suffisant pour répondre aux objectifs de l'étude, en tenant compte des résultats préliminaires ayant permis de raffiner les aspects techniques per- et post-opératoires et de la variabilité inhérente au modèle expérimental. Dans l'objectif de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude nous réaliserons séquentiellement des mesures non-invasives de fonction rénale. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons également mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses ex vivo au moment du sacrifice.

Les résultats de cette étude sont susceptibles d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en transplantation rénale, en particulier par la préservation des EETs lors du préconditionnement du greffon et au cours de la période post-transplantation précoce, lorsque les conséquences de l'ischémie-reperfusion sont un déterminant majeur de la dysfonction de l'organe greffé.

1087- Présent à l'état de traces dans l'organisme, le sélénium est un oligo-élément essentiel au bon développement de nombreux organismes vivants dont l'Homme. Ce nutriment est apporté par l'alimentation, et en particulier dans les céréales, les légumineuses (haricots, lentilles) et les fruits de mer.

Dans tous les types cellulaires, le sélénium exerce ses effets biologiques grâce à son incorporation dans des protéines spécifiques, appelées sélénoprotéines (Sel). Cette incorporation se fait sous forme de sélénocystéine, un analogue de la cystéine. De ce fait, la sélénocystéine est considérée comme le 21ème acide aminé participant à la synthèse des protéines.

Actuellement, 25 sélénoprotéines sont identifiées chez l'Homme avec de nombreuses fonctions biologiques. Le caractère indispensable des sélénoprotéines a été montré par un modèle de souris transgéniques invalidées pour l'ensemble d'entre elles. Ce modèle repose sur la délétion de l'ARN de transfert (ARNt) appelant l'intégration d'une sélénocystéine dans la séquence primaire des protéines. Cette délétion a été montrée comme létale chez les animaux dès le développement embryonnaire. Pour autant, les rôles spécifiques des sélénoprotéines individuellement dans des fonctions biologiques restent à déterminer.

La sélénoprotéine T (SelT), récemment identifiée, est membre d'une sous-famille incluant les Sel W, H et V. Il a été montré que cette protéine de 195 acides aminés est largement distribuée dès le développement embryonnaire dans de nombreux tissus mais son expression tend à disparaître à l'âge adulte dans la majorité de ceux-ci. Cette absence de SelT dans les tissus matures suggère qu'elle n'y exerce pas de rôle majeur dans des conditions physiologiques basales. En effet, le peu de résultats publiés démontre que la SelT est principalement localisée dans l'appareil de Golgi et dans le réticulum endoplasmique, et semble jouer un rôle dans la mobilisation du calcium intracellulaire. En effet, la surexpression de la SelT augmente la mobilisation calcique et à l'inverse, l'inhibition de la SelT via l'utilisation d'un short hairpin RNA (shRNA) diminue les voies de signalisation induites par le Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide. Cependant, le rôle précis de la SelT dans la mobilisation du calcium intracellulaire mais également dans d'autres fonctions biologiques n'est pas encore clairement établi.

Par ailleurs, la SelT pourrait jouer un rôle dans des pathologies ischémiques telles que les accidents vasculaires cérébraux, puisque l'expression de la SelT est induite lors d'une ischémie cérébrale chez la souris. Ces résultats suggèrent un rôle possible de la SelT dans d'autres pathologies ischémiques telles que l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque, cependant aucune recherche concernant la réexpression ou l'implication de la SelT dans ces conditions, et en particulier le rôle de la SelT vasculaire, n'a été entreprise à ce jour.

Les buts de présent projet sont

- 1) de déterminer une réexpression de la SelT dans lors de l'ischémie cardiaque induite chez le souris par une ischémie-reperfusion et au cours du développement de l'insuffisance cardiaque chez le souris et
- 2) de déterminer le rôle protecteur de la SelT cardiaque, vasculaire et endothélial chez des souris (en comparant la fonction cardiovasculaire des souris délétées pour la SelT (n=150) à celle des souris normales (n=150) et avec ou sans ischémie-reperfusion cardiaque.

3) En fin, l'évaluation des effets cardiovasculaires de l'administration de la SelT après un ischémie-cardiaque chez le souris (n=300) devraient démontrer/confirmer le potentiel thérapeutique de la SelT dans l'ischémie-reperfusion cardiaque et ces conséquences.

1088- Des études épidémiologiques ont établi un lien entre l'accumulation de tissu adipeux dans la région intra-abdominale (obésité viscérale) et le risque de développer un diabète de type-2. L'état d'inflammation chronique, qui caractérise le tissu adipeux viscéral du sujet obèse, est considéré comme un facteur important de la détérioration de l'homéostasie glucidique. Les mécanismes cellulaires impliqués commencent à être décryptés. Ils mettent en jeu des modifications phénotypiques des macrophages et des lymphocytes T du tissu favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires. Dans le contexte des maladies auto-immunes, le facteur de transcription IRF5 (Interferon Regulatory Factor-5) joue un rôle majeur dans la polarisation pro-inflammatoire des cellules immunitaires. Nos résultats préliminaires chez l'homme révèlent que l'expression d'IRF5 est augmentée dans le tissu adipeux de sujets obèses et diminués après perte de poids, ce qui suggère un rôle délétère de ce facteur dans l'obésité humaine. Ce projet de recherche a pour objet de définir et d'identifier l'implication du facteur de transcription IRF5 dans les altérations du tissu adipeux associées au diabète de type-2. A terme, réduire l'activité d'IRF5 pourrait être proposé comme une nouvelle approche thérapeutique pour contrôler l'inflammation et/ou l'expansion du tissu adipeux intra-abdominal et atténuer le risque de diabète de type-2.

La stratégie des 3R sera respectée. Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux.

Nombre d'animaux utilisés :

Protocole expérimental: étude du phénotype métabolique, inflammatoire des souris invalidées pour IRF5 spécifiquement au niveau de l'adipocyte (IRF5 AdipoKO) et des macrophages (IRF5 MacKO) soumis à un régime normal ou un régime riche en graisse.

Nombre d'animaux : 160 souris au total, soit pour chaque lignée murine :

Régime normal (chow diet) : 80 souris

20 souris témoins WT AdipoKO et 20 souris IRF5 AdipoKO

20 souris témoins WT MacKO et 20 souris IRF5 MacKO

Régime riche en graisse (High fat diet = HFD) : 80 souris

20 souris témoins WT AdipoKO et 20 souris IRF5 AdipoKO

20 souris témoins WT MacKO et 20 souris IRF5 MacKO

1089- Le syndrome d'Andersen est une maladie rare, caractérisée par une triade de symptôme : paralysie périodique, arythmie cardiaque et problèmes de développement osseux. Un seul gène a été associé à cette pathologie, le gène KCNJ2 codant pour un canal potassique à rectification entrante, Kir 2.1. Son rôle principal est le maintien du potentiel de repos dans les cellules.

Une trentaine de mutations, faux-sens ou délétion, ont été identifiées sur ce canal, aboutissant toutes à une perte de fonction par un effet de dominance négative. En effet, le canal étant homo tétramérique, les sous-unités mutantes peuvent s'associer aux sous-unités sauvages, rendant le canal inactif. Le phénotype associé à une mutation dans ce canal est donc facilement compréhensible dans les cellules excitables, telles que les cellules cardiaques et musculaires. Cependant, le rôle précis de ce canal dans le développement osseux n'est pas connu. De plus, le KO (inactivation complète) de KCNJ2 chez la souris est létal quelques heures après la naissance, suite à une malformation du pallet. Des travaux récents de notre équipe ont montré que le canal potassique Kir2.1 était essentiel à la morphogénèse osseuse in vitro. En effet, seuls des myoblastes de patients sains se différencient en ostéoblastes alors que les myoblastes Andersen n'en sont pas capables. Cependant, une surexpression du Kir2.1 sauvage chez les myoblastes Andersen inverse le phénotype, rendant ces cellules capables de se différencier en ostéoblastes.

Afin d'étudier la physiopathologie du canal potassique Kir2.1, nous avons, dans un premier temps, généré des cellules iPS (induced pluripotent stem ce lls) à partir de myoblastes issus de biopsies musculaires de patients Andersen ou d'individus contrôles.

La caractérisation des iPS passe par l'expression de différents marqueurs membranaires et génétiques (marqueurs de la pluripotence, typiques des cellules souches embryonnaires) mais également par leur capacité à se différencier dans les trois feuillet embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme).

Pour tester cette caractéristique, nous devons former des tératomes dans des souris nude immunodéprimées. Les tératomes sont des tumeurs composées de cellules des trois feuillet embryonnaires. La formation de tératomes permet de démontrer la pluripotence des cellules iPS in vivo, afin de valider leur utilisation comme modèle d'étude. Une fois les iPS caractérisées, nous projetons de les utiliser pour étudier l'implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogénèse osseuse, ainsi que dans d'autres types cellulaires.

1090- La parathormone ou hormone parathyroïdienne (PTH en anglais) joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme phosphocalcique. Une diminution de la calcémie entraîne une augmentation de la sécrétion de PTH, alors qu'une augmentation de la calcémie et un apport élevé en vitamine D inhibe la sécrétion de PTH.

D'un point de vue diagnostic, le dosage sanguin de l'hormone parathyroïdienne, associé à un dosage de la calcémie, permet d'établir le diagnostic d'hyperparathyroïdie.

Une surveillance et un traitement peuvent ainsi être mis en place, avec notamment un suivi des conséquences qu'elle entraîne au niveau osseux.

Dans ce contexte nous souhaitons développer un test de dosage de cette hormone dans les sérums humains. Ce test sera un immuno-essai, dont le principe repose sur la réaction anticorps-antigènes et qui nécessite donc de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux sensibles et spécifiques. De nombreux essais d'immunisation réalisés depuis 2010 pour l'obtention d'anticorps monoclonaux, ont montré la faisabilité de l'approche mais n'ont pas abouti, faute d'une sensibilité suffisante. Les anticorps polyclonaux sont connus pour apporter la sensibilité faisant parfois défaut aux anticorps monoclonaux. C'est dans ce contexte que nous souhaitons pouvoir immuniser des animaux afin d'obtenir des immunsérums qui, une fois purifiés, donneront les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux, l'immunogène et la procédure ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Les animaux retenus devraient, en outre, permettre de constituer un stock d'anticorps couvrant de nombreuses années de production, les antisérums ayant dans notre société une durée de conservation de 16 ans.

1091- L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer et de valider un modèle de sous-nutrition modérée chez la vache laitière avant le pic de lactation. La stratégie est de diluer le régime alimentaire habituel en utilisant un aliment encombrant (paille d'orge) pour diluer la densité énergétique du régime, tout en conservant une ingestion de matière sèche ad libitum. La période de restriction sera d'une durée de 7 jours, et débutera après la 3^{ème} semaine de lactation. Ce projet constitue une expérimentation pilote préliminaire à un programme de recherche «Ruminflame », financé par le Méta-programme INRA GISA, dont l'objectif général est d'étudier les facteurs, nutritionnels notamment, qui modulent la sensibilité des ruminants laitiers à l'infection. Après le vêlage, l'augmentation de la production laitière et le bilan énergétique négatif (BEN) des vaches laitières conduisent à une lipomobilisation des tissus adipeux se traduisant par une augmentation des acides gras non estérifiés (AGNE) dans le sang (Chilliard et al., 2000). Les concentrations élevées en AGNE et B-hydroxybutyrate observées dans le sang pendant la période périnatale altèrent la fonction immunitaire (Burvenich et al., 2007 ; Sordillo et Raphael, 2013). Ces indicateurs seront suivis pendant la période expérimentale grâce à des prises de sang réalisées sur les animaux.

1092- L'athérosclérose est la cause de plus de la moitié des décès dans les pays industrialisés occidentaux et représente un problème de santé. Sa formation est lente et progressive, et peut débuter dès l'enfance. C'est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères caractérisée par un épaississement intimal qui se développe par infiltration et prolifération des cellules musculaires lisses (CML), de monocytes-macrophages et de lymphocytes (formation de la plaque d'athérome). Ceci conduit à un rétrécissement de la lumière des vaisseaux et peut favoriser la formation de thrombus. Afin de mieux prévenir et traiter cette maladie, il est indispensable d'élucider avec précision les mécanismes favorisant sa progression.

La modification phénotypique des CML vasculaire est un processus réversible et un déséquilibre entre le phénotype prolifératif/synthétique et contractile peut conduire au développement et/ou à la progression de maladies vasculaires en réponse à des signaux environnementaux anormaux.

Nous avons montré que la « semicarbazide-sensible amine oxydase » (SSAO) encore appelée VAP-1 (vascular adhesion protéine 1) est une enzyme générant des aldéhydes, et du peroxyde d'hydrogène, molécules hautement réactives. Elle augmente très fortement au cours de la différenciation des CML vasculaires. La SSAONAP-1 pourrait également participer à l'oxydation des LDL et à l'inflammation, via sa forme soluble présente dans le sérum. Celle-ci est augmentée dans le plasma de patients atteints de maladies cardiovasculaires et inflammatoires, elle pourrait induire une cytotoxicité sur les cellules endothéliales et sur les CML et une apoptose des CMLv.

Hypothèse: La SSAONAP-1 pourrait ainsi contribuer à l'athérogenèse.

Objectifs principaux et stratégie expérimentale:

Notre objectif est de mettre en évidence l'implication de la SSAO dans les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en œuvre dans la réponse immunitaire, l'inflammation et la différenciation des CML conduisant à l'athérosclérose. Pour cela nous utiliserons un modèle animal développant de l'athérosclérose (souris APOE-I-) invalidée pour le gène de la SSAO (souris APOE-I-SSAO-I-). Un collaborateur étudiera pour nous la réponse immunitaire adaptative et le trafic des cellules de l'immunité.

La deuxième approche in vitro, reposera sur la culture de CML des souris pour étudier les mécanismes mis en jeu dans le phénotype observé.

L'étude sera menée chez des souris âgées de 15 semaines, phase précoce où les lésions athéromateuses commencent à se développer et à 25 semaines où les plaques d'athérome sont bien établies.

1093- Le projet s'intègre dans la thématique principale de la recherche des déterminants cellulaires et moléculaires de la rigidité artérielle et de l'hypercoagulabilité. Il est ciblé sur deux molécules des cellules musculaires lisses vasculaires (CML): l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le facteur de transcription SRF ((Serum Response Factor)

Contexte scientifique

La rigidité artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire (CV) indépendant. Elle est définie par une diminution de la distensibilité artérielle. Elle est responsable de l'hypertension artérielle systolique du sujet âgé dont la prévalence dépasse 60%.

L'hypercoagulabilité se définit par une augmentation de la réactivité du système de la coagulation en réponse à un stimulus. Elle confère un état de prédisposition à la thrombose ou thrombophilie. Rigidité et hypercoagulabilité augmentent ainsi le risque CV dans 4 affections principales : l'hypertension artérielle (HTA), l'insuffisance cardiaque (IC), les thrombophilies acquises singulières comme celles liées aux anticorps anti-phospholipides (APL), et le vieillissement artériel. La recherche de thérapeutiques spécifiques mieux ciblées de la rigidité et de l'hypercoagulabilité est devenue aujourd'hui un sujet à part entière dans le cadre du risque CV.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont largement élargi notre compréhension des facteurs moléculaires, cellulaires et génétiques de la rigidité artérielle. Les gènes les plus associés aux paramètres de rigidité sont ceux du système rénine-angiotensine-aldostérone, ceux intervenant dans la maturation des fibres élastiques et dans la voie du NO. Au plan structural la rigidité artérielle est généralement la résultante de la rigidité passive correspondant aux fibres d'élastine et de collagène et de la rigidité active due à l'activation du muscle lisse vasculaire. Un autre élément majeur participant aux propriétés mécaniques des artères est le tonus vasomoteur assuré en grande partie par un couplage entre les cellules endothéliales (CE) et les CML.

Plus récemment, nous avons montré l'implication d'autres déterminants comme la fibronectine, les crosslinks de la matrice extra cellulaire et la desmine. Il apparaît à ce jour que de multiples voies cellulaires et moléculaires peuvent contribuer au phénotype de rigidité. Nous avons proposé que les attachements au sein de la matrice ou les interactions cellules-matrice en relation avec l'activation du muscle lisse vasculaire représentent le point de convergence de ces différents mécanismes.

La paroi artérielle joue également un rôle majeur dans la coagulation en fournissant différents facteurs impliqués dans la régulation de la génération de thrombine. Il est bien établi que l'âge induit parallèlement (i) des modifications structurales et moléculaires augmentant progressivement la rigidité et (ii) une augmentation des événements thrombotiques. Nous venons de démontrer que la pulsatilité de la pression artérielle entraine une augmentation de la synthèse et de la libération de facteurs anticoagulants par les CML.

Notre hypothèse de travail est qu'il existe des déterminants communs de la rigidité et de l'hypercoagulabilité impliquant des changements phénotypiques des CML. Des résultats préliminaires nous incitent à penser que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ au sein des structures d'adhésion focales et le facteur de transcription du muscle lisse SRF sont impliqués dans la rigidité artérielle et la coagulation.

1094- Depuis des années, les cellules embryonnaires souches (ES) sont très largement connues et utilisées par la communauté scientifique pour la transgénèse chez la souris. Néanmoins, jusque très récemment, chez le rat aucune lignée ES n'avait été encore établie.

Cette découverte ouvre de nouvelles portes pour la génération de modèles transgéniques chez le rat.

Ces lignées de rats peuvent devenir des modèles de maladie humaine et vont permettre de mieux comprendre le processus de développement des maladies humaines. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces rats, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques. Toutes les lignées générées le seront au stade hétérozygote et donc aucun phénotype lié à la modification génétique n'est attendu.

Les embryons de rats manipulés, pour être génétiquement modifiés, sont produits par super-ovulation de rats femelles. Cette super-ovulation est pratiquée par injection d'hormones (pour augmenter le nombre d'embryons produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée transgénique.

Ces embryons sont ensuite micro-manipulés par l'injection de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées dans la cavité d'un embryon âgé de 4,5 jours appelé blastocyste.

Ces embryons manipulés sont ensuite réimplantés dans une rate mère-porteuse, en pratiquant une petite intervention chirurgicale.

Les ratons, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques.

Toutes ces techniques nécessitent l'utilisation d'animaux. La réduction du nombre de rats utilisés, leur bien-être est une préoccupation permanente. L'amélioration des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement.

1095- Les études de toxicologie par administration unique ou répétée sont réglementairement requises par les lignes directrices ICH (International Committee of Harmonization)/EMEA pour les médicaments humains et vétérinaires, OCDE/Reach pour la chimie et ISO10993 pour les dispositifs médicaux. Ces études sont des pré-requis aux essais cliniques de phase I, II ou III. Elles visent à définir le profil de toxicité des produits à tester et donc orienter le suivi clinique des volontaires sains et patients incorporés dans les essais cliniques. Elles ont également pour objectif de définir le niveau de dose (marge de sécurité) pour la première administration à l'homme ou l'animal. Ces études incluent des évaluations toxico-cinétiques pour déterminer les taux d'exposition entraînant une toxicité. La durée des études de toxicologie varie en fonction du stade de développement du produit à tester et de sa posologie.

Pour la chimie, ces études permettent de constituer des fiches de données de sécurité pour la protection des utilisateurs et des travailleurs.

Les études de toxicologie sont réalisées sur les espèces suivantes: rat, souris, cobaye, hamster, lapin, chat, chien, porc, macaque cynomolgus, marmouset.

Le nombre d'animaux utilisés par étude de toxicologie est de 3 par groupe et par sexe au maximum pour les non rongeurs et de 10 par groupe et par sexe au maximum pour les rongeurs. Les études de toxicologie sont réalisées sur 4 à 10 groupes au maximum.

1096- La technique de télémetrie vise à enregistrer chez l'animal vigile différents paramètres physiologiques tels que des pressions comme la pression artérielle, des bio-potentiels comme l'électrocardiogramme, l'électroencéphalogramme, des températures comme la température corporelle ou l'activité motrice. Le principe de cette technique consiste à implanter un émetteur radio muni de capteurs de pression ou de bio-potential pour enregistrer les paramètres physiologiques précités. De par son principe, cette méthode permet d'enregistrer les paramètres physiologiques en évitant le stress des animaux car ceux-ci sont laissés dans leur environnement familier pendant les mesures. Un autre avantage réside dans le fait que cette technique permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour tester plusieurs candidats médicaments grâce à la durée de vie des batteries des émetteurs radio. Cette technique est applicable pour toutes les espèces: rat, cobaye, lapin, chat, chien, porc, macaque *Cynomolgus*, marmouset. Les dommages escomptés sont relatifs à l'implantation chirurgicale des émetteurs.

Le nombre d'animaux utilisés par étude de télémetrie est de 4 à 6 par groupe pour les non rongeurs et 6 à 8 par groupe pour les rongeurs. La majorité des études est réalisée sur un groupe, le nombre de groupe pouvant être de 4 au maximum.

1097- L'approche le projet est le développement d'implants cellulaires qui permettent de délivrer des substances thérapeutiques de manière autonome, et pourrait à l'avenir remplacer la prise régulière de médicaments. Des cellules modifiées génétiquement par des techniques de biologie synthétique sont encapsulées dans des enveloppes semi-imperméables, ce qui les rend indétectables par le système immunitaire, si bien qu'elles sont tolérées sans problème par les souris. Le circuit génétique programmé permet détecter un marqueur spécifique d'une maladie ou une molécule inductrice d'intérêt clinique et de relâcher dans le sang un peptide thérapeutique ou une protéine rapportrice. Les cellules programmées sont d'abord testées, in-vitro. La réactivité des cellules aux marqueurs de la maladie est ainsi ajustée. Une fois le circuit thérapeutique validé, quelques centaines de capsules sont implanté dans l'abdomen des souris et le marqueur thérapeutique est mesuré dans le sang.

1098- De nombreuses disciplines de la recherche biomédicale ont recours à l'utilisation de souris portant une ou plusieurs modifications génétiques. Certaines lignées portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène (lignées transgéniques) alors que d'autres sont déficientes pour un gène qui a été rendu inactif soit en permanence, soit sous l'effet d'un traitement chimique, soit sous l'effet d'un autre gène. Il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris.

L'élevage des lignées doit être pris en charge par du personnel compétent, selon des règles strictes afin d'assurer le bien-être des animaux et d'ajuster le nombre d'animaux produits aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Ce projet concerne la décontamination et l'élevage en zone protégée (barrières SOPF, SPF ou isolateur) d'environ 350 lignées génétiquement modifiées pour répondre à la demande d'une centaine de chercheurs. La décontamination des lignées est réalisée en transférant stérilement des embryons par voie chirurgicale dans une femelle receveuse. Les jeunes sont accouplés pour établir une nouvelle colonie. Pour une partie des lignées, le génotype des souriceaux doit être déterminé à partir d'une biopsie tissulaire ou d'un prélèvement sanguin. Les animaux ne possédant pas le génotype souhaité ou en surnombre par rapport aux besoins des chercheurs sont euthanasiés dès le sevrage par une méthode autorisée.

La nécessité de recourir à ces modèles animaux est justifiée dans chacun des projets qui les utilisent. Le nombre d'animaux produits pour chaque lignée est révisé périodiquement avec les chercheurs en fonction de leurs projets, afin d'ajuster au mieux ce nombre aux besoins réels et d'éviter de produire des animaux inutilement.

Les dommages infligés aux animaux sont limités à l'identification et aux prélèvements de tissus ou de sang pour les souriceaux qui doivent être génotypés. Les lignées élevées ne présentent pas de phénotype dommageable pour l'animal. Le niveau de sévérité est modéré pour la réimplantation chirurgicale d'embryons et léger pour l'élevage des lignées. Cette activité conduira, en 5 ans, à la production d'environ 190.000 souris utilisées ensuite dans plusieurs dizaines de projets autorisés.

1099- Les méthodes d'imagerie moléculaire nucléaire (notamment en tomographie par émission de positon (TEP) et en tomographie par émission monophotonique (TEMP)) des tumeurs cérébrales peuvent contribuer à leur détection précoce ainsi qu'au suivi des patients après une intervention thérapeutique. Un certain nombre d'études (surtout précliniques) a récemment démontré l'efficacité d'imagerie en TEP des glioblastomes en utilisant des radioligands TEP de la protéine de translocation (TSPO). La TSPO est une protéine de la mitochondrie qui n'est pas exprimée dans le cerveau sain. En revanche, son expression par des cellules du cerveau, notamment par les astrocytes et la microglie, peut être augmentée dans certaines pathologies, telles que les tumeurs cérébrales et la neuroinflammation.

Le projet d'une durée de 12 mois et concernant 20 souris a comme but d'évaluer l'imagerie in vivo en TEMP du glioblastome avec le ¹²³I-CLINDE, un radioligand de la TSPO, dans le modèle de glioblastome par implantation de cellules GL26 chez la souris. Notre étude comprendra des études d'imagerie in vivo en TEMP et des études post-mortem avec de l'autoradiographie de coupes de cerveau ainsi que des méthodes d'histologie et de biologie moléculaire afin de démontrer la spécificité et la sensibilité du ¹²³I-CLINDE pour localiser les tumeurs.

1100- Projet s'inscrivant dans le cadre du programme de recherche INTER-REG IV A "Micro" qui a notamment pour objectif de mieux comprendre les effets que peuvent avoir des fines particules de plastiques (microplastiques) s'accumulant dans le réseau trophique des écosystèmes marins, sur la physiologie des poissons.

Les larves de poissons marins, qui éclosent à un stade de développement très précoce et qui sont de fait très sensibles aux facteurs environnementaux, peuvent être naturellement exposées aux microplastiques qui contaminent le plancton. Les effets de cette exposition sur le développement et la physiologie de la larve et du futur juvénile sont, à ce jour, inconnus.

Dans ce contexte, nous cherchons à déterminer expérimentalement l'impact que peut avoir l'ingestion de particules de microplastiques par des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*). Maitrisant l'élevage larvaire de cette espèce ainsi que la formulation et la fabrication des aliments répondant à leurs besoins nutritionnels, nous proposons d'incorporer à l'aliment distribué durant l'élevage larvaire des particules calibrées de microplastiques de type « Polyéthylène ». Les tailles et les concentrations de particules ont été déterminées afin de mimer au mieux l'ingestion des microparticules présentes dans le zoo/phyto plancton dans le milieu naturel. Les propriétés fluorescentes des particules utilisées permettront de suivre le devenir des microparticules dans le tractus digestif de la larve. La croissance des larves et plusieurs paramètres seront appréhendés au cours et à l'issue de l'élevage larvaire afin de déterminer l'impact qu'a eu l'ingestion des microplastiques sur la physiologie des animaux.