



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 (34)

3401. Récemment, nous avons trouvé que l'expression de deux gènes impliqués dans la synthèse de sucres régulatrices du comportement cellulaire se trouve 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 de souris de la lignée rTg4510 [JAX#015815 FVB-Tg(tetO-MAPT\*P301L)#Kha/Jlws] adultes pour analyser en suite des caractéristiques définies de la pathologie par de techniques histologiques et biochimiques.

Ce projet permettra de clairement confirmer l'importance de ses enzymes dans le développement/évolution de la maladie chez le mammifère avec, comme conséquence, une meilleure compréhension des mécanismes patho-physiologiques 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 à utiliser dans ce projet a été conçu pour d'obtenir un maximum d'informations avec un nombre d'animaux optimisés et statistiquement suffisant pour chaque groupe de l'étude. 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 surexpressions. Chaque groupe sera subdivisé en sous-groupes de 6 animaux afin d'étudier l'effet de la modulation de l'expression des 2 gènes à 3 différents temps 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 penthiobarbital sodique dans l'animal endormi). Le tissu cérébral sera récupéré pour 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.

3402. La perte de fonction d'un gène par modification structurale permet de rendre compte de la fonction de ce gène. La modification structurale peut être réalisée par une cassure ciblée du gène au moyen d'une nucléase guidée par un polypeptide ou un acide nucléique. Comme le processus de réparation de l'ADN après clivage est imparfait (non homologous end-joining), il en résulte fréquemment la création d'allèles « nuls ».

Il a été montré récemment chez le poisson zèbre, que la ribonucléoprotéine Cas9/gRNA est capable de clivage dirigé si le l'ARN guide (gARN) injecté dans la cellule oeuf comporte une séquence complémentaire d'une portion du gène que l'on cherche à invalider. Dans le projet que nous soumettons nous souhaitons tester la faisabilité de cette méthode chez la truite pour mettre en oeuvre la génomique fonctionnelle de cette espèce d'intérêt agronomique. Nous réaliserons l'expérience sur le gène myogénine: un régulateur essentiel de la différenciation musculaire.

Il s'agira concrètement de faire produire des oeufs par une truite femelle maturante. Puis d'injecter l'ARN cas9 et le gRNA dans les oeufs fraîchement fécondés. Les larves qui en dériveront feront l'objet d'un génotypage. Enfin, des croisements des animaux présentant un allèle modifié seront réalisés afin d'établir l'homozygotie pour la mutation.

R1 : Nos études portant sur le développement musculaire après invalidation de la myogénine ne peuvent être réalisées que sur l'organisme entier et non pas sur des cultures cellulaires.

R2 : les effectifs sont réduits au maximum pour obtenir environ une dizaine d'animaux présentant une variation allélique (mono et/ou bi-allélique) induite. Cet effectif devrait garantir l'obtention d'animaux homozygote après croisements.

R3 : Le prélèvement des oeufs se fera sous anesthésie selon une procédure établie (ci-jointe). Les animaux qui présenteraient des anomalies morphologiques et/ou comportementales liées à l'injection (perturbatrice) dans l'oeuf ou (spécifiquement) à la modification génétique induite seront sacrifiés dès les premières manifestations d'anormalité selon les procédures d'euthanasie en vigueur.

3403. La réserve cognitive englobe tous les éléments favorisant les fonctionnalités synaptiques et retardant la survenue du déclin des fonctions intellectuelles lors du vieillissement. Elle contribue à protéger ainsi des processus neurodégénératifs de la maladie d'Alzheimer et des démences séniles. De manière générale, les facteurs protecteurs renforcent cette réserve, alors que les facteurs de risque l'affectent et favorisent en conséquence le vieillissement cérébral. Il est donc logique de considérer comme particulièrement préjudiciable tout événement survenant durant la période cruciale du développement embryonnaire et périnatal susceptible de contrarier la mise en place et la maturation normale du système nerveux central.

Le projet Toxamyl vise à évaluer chez la souris l'influence à long terme d'une exposition périnatale à des micropolluants neurotoxiques, les polychlorures biphényles ou PCB, présents dans l'alimentation et l'environnement, sur la susceptibilité persistante à l'âge adulte vis-à-vis du stress amyloïde spécifique de la maladie d'Alzheimer. Dans le souci de réduire le nombre d'animaux, ce projet n'utilisera que des souris excédentaires issues d'une étude préalable (NeuroDeveTox) ayant déjà nécessité une exposition aux PCB. Plusieurs mois après cette exposition, ces souris devenues adultes seront soumises à un nouveau protocole incluant l'induction d'un stress amyloïde et l'évaluation de ses conséquences par l'exploration des capacités mnésiques et de l'intégrité synaptique cérébrale. La sévérité des troubles mnésiques et le degré d'altération des profils synaptiques cérébraux permettront de définir si l'exposition périnatale aux polluants a sensibilisé les souris au stress amyloïde. Ce projet Toxamyl doit donc nous permettre de faire la preuve que la sensibilité au risque neurodégénératif peut être liée à des paramètres de nature toxicologique.

Le projet Toxamyl a été conçu dans le respect de la règle des 3R.

- Réduire Six groupes de 12 souris seront constitués, soit au total 72 animaux. Ce nombre a été fixé au minimum pour satisfaire aux exigences des interprétations statistiques des résultats.

- Raffiner Tout au long du projet, nous serons soucieux du bien-être des souris. Les procédures utilisées et les injections intracérébroventriculaires (icv) nécessaires sont d'un degré de sévérité modérée. L'administration par voie intrapéritonéale du mélange kétamine/xylazine permet de maintenir l'anesthésie durant toute l'opération. Une procédure d'analgésie est mise en place après l'opération avec une injection sous cutanée de Métacam®, un inhibiteur des cyclooxygénases démontré n'avoit aucune influence sur les effets biologiques testés dans l'étude. Nous vérifierons aussi chaque jour leur état général afin de surveiller les points limites et identifier l'éventualité d'une perte de poids excessive supérieure à 10%, l'arrêt de la prise alimentaire solide et l'apparition de tremblements, prostration, diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs ; hypothermie prolongée ; pilo-érection ; diarrhées prolongées ; respiration anormale ; absence de toilettage. En période post-opératoire, en particulier lors de la phase de réveil et durant les 3 jours suivants, les souris seront surveillées 2 fois par jour pour repérer l'apparition éventuelle de signes de souffrance physique, d'hypothermie ou d'anomalies comportementales.

- Remplacer Le modèle animal ne peut ici être remplacé par aucun autre modèle : depuis l'exposition périnatale indirecte aux PCB jusqu'à l'évaluation des performances cognitives, le modèle d'étude est nécessairement un organisme entier. Développée au laboratoire, la souris modèle choisie offre les qualités d'un outil expérimental parfaitement adapté pour évaluer les fonctionnalités cérébrales et les effets de traitements, neuroprotecteurs ou délétères, sur les capacités d'apprentissage et de mémoire.

3404. L'allergie alimentaire est un enjeu majeur de santé publique qui ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement. La seule thérapie de l'allergie reconnue par l'OMS est l'immunothérapie spécifique. Cependant les traitements actuels, immunothérapie sublinguale ou l'immunothérapie sous-cutanée ne sont pas adaptés pour l'allergie alimentaire. DBV-technologies développe des traitements spécifiques des allergies alimentaires, plus particulièrement contre l'allergie à l'arachide. L'immunothérapie épicutanée permet le traitement de l'allergie alimentaire sans risque de choc anaphylactique pour les patients.

L'étude des mécanismes immunologiques impliqués dans l'immunothérapie épicutanée nécessite l'étude dans un modèle animal qui permet d'intégrer toutes les composantes immunitaires depuis la prise en charge de l'allergène au niveau de la peau jusqu'à l'induction d'une désensibilisation. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de substitution intégrant tous ces paramètres.

L'utilisation d'un modèle de souris est particulièrement adaptée à cette étude. En effet, les composantes immunologiques sont relativement proches de celles de l'homme. Le système immunitaire de la souris est suffisamment connu pour permettre l'accès aux "outils" d'analyse et permettent donc d'appréhender les réponses immunes.

La souris Balb/c est reconnue comme un bon modèle pour l'allergie de par la facilité d'induire la production d'immunoglobuline E et des réponses de type Th2 lors d'une procédure de sensibilisation. Ce modèle de souris sensibilisées par voie orale à l'arachide a ainsi permis de montrer l'efficacité de l'immunothérapie épicutanée

Cependant, les mécanismes impliqués dans cette efficacité restent encore peu étudiés. Le but de l'immunothérapie spécifique est l'induction d'une désensibilisation voir d'une tolérance à long terme. Plusieurs études chez l'homme ont montré qu'une

désensibilisation efficace s'accompagnait de l'augmentation de cellules T régulatrices. Cependant, le rôle fondamental de ces cellules reste à démontrer, ainsi que leur caractérisation précise.

Au sein de nos laboratoires de recherche, nous avons pu montrer que dans des modèles de souris sensibilisées à l'arachide, l'immunothérapie épicutanée permettait de désensibiliser les animaux et d'induire des cellules T régulatrices.

Le but de ce projet sera de caractériser ces cellules T régulatrices induites au cours du traitement, de définir leur rôle primordial et leur mécanisme d'action. Ces résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de désensibilisation.

De plus, les cellules T régulatrices induites au cours de l'immunothérapie épicutanée seront comparées aux cellules induites par d'autres immunothérapies, l'immunothérapie sublinguale et l'immunothérapie sous cutanée, afin de comprendre les potentiels bénéfiques de ce traitement par rapport aux traitements connus sur l'induction de tolérance.

Ce projet comportera plusieurs expérimentations, incluant un total de 610 souris, permettant de répondre aux différentes questions posées en prenant soin d'avoir suffisamment d'animaux dans chaque groupe d'études permettant les analyses statistiques nécessaires et d'éviter la reproduction des expériences. Toutes les mesures permettant de diminuer les variations, pouvant être dues aux stress ou à d'éventuelles douleurs seront mises en œuvre afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires.

3405. Le projet NanoENO vise à développer un agent de contraste basé sur l'encapsulation de fluorophores dans des Lipidots®, nanovecteurs lipidiques dont la technologie est brevetée. Ce vecteur est totalement biodégradable, non toxique, et son injection intraveineuse à forte dose ne provoque pas de réaction inflammatoire chez le rat. Il offre une forte capacité de charge et permet un ciblage actif et passif des tissus pathologiques. Sa fabrication est non polluante et aisément industrialisable. Les Lipidots® ont été utilisées en imagerie de fluorescence préclinique et leurs potentialités pour leur utilisation clinique ont été démontrées.

Ce produit sera utilisé pour l'imagerie optique per-opératoire pour guider l'ablation de la tumeur ou analyser les biopsies ex-vivo. Le ciblage des tumeurs sera assuré par ciblage actif à l'aide d'agent de ciblage peptidique et/ou passif par effet EPR. Le produit développé est déjà testé sur modèle rongeur pour prouver la validité du concept en quantifiant le contraste des images entre tissu sain et tissu pathologique.

Le but de notre projet est d'évaluer les effets aigus potentiels liés à l'administration de doses uniques injectées par voie intraveineuse à 3 chiens avant passage à l'étude clinique chez des chiens atteints de sarcomes spontanés. Il s'agit du nombre minimum d'animaux utilisable pour obtenir des résultats exploitables: chaque animal recevra une dose différente.

Le bénéfice attendu est une résection plus complète des tumeurs grâce à une visualisation précise, et donc une augmentation des chances de guérison pour l'animal malade.

Durant cette étude, tout sera mis en œuvre pour limiter le stress auquel les animaux sont soumis. Une attention particulière sera portée aux soins quotidiens, réalisés par du personnel qualifié, et à l'hébergement, qui se fera en groupe, avec des jouets à disposition des animaux.

Aucune méthode de remplacement n'est disponible, le projet portant sur une évaluation de toxicité systémique après injection intraveineuse. L'espèce cible de ce traitement est le chien, c'est pourquoi cette espèce a été choisie pour le projet.

3406. Après une administration orale d'un médicament, la molécule active après un passage dans l'estomac, va accéder à l'intestin. En fonction de ses propriétés physico-chimiques, la molécule pourra passer au travers de la paroi intestinale pour rejoindre la circulation sanguine et le foie.

Seule la dose de médicament capable de traverser la barrière intestinale et le foie rejoindra la circulation générale et pourra être ainsi délivrée sur son site d'action.

Il est donc fondamental de déterminer cette fraction de médicament qui atteint sa cible par rapport à la dose ingérée.

Chaque molécule lorsqu'elle atteint la circulation sanguine va se distribuer d'une façon spécifique dans l'organisme.

Afin d'étudier cette distribution une administration intraveineuse sera nécessaire, il sera donc ainsi possible de relier la concentration administrée par voie orale à celle observée pour une même dose administrée directement dans la circulation sanguine par voie intraveineuse.

Ces rapports de concentrations permettront de calculer la biodisponibilité absolue de la molécule et de ce fait, son potentiel de succès lors de son développement réglementaire.

Ce type d'étude peut se réaliser sur des rats ou des souris.

En général 4 composés sont testés lors d'une même étude afin de sélectionner le meilleur candidat.

Une étude nécessitera ainsi l'utilisation de 16 rats ou de 48 souris.

Sur 5 ans, un total de 2000 rats et 6000 souris seront utilisées.

Ce type d'étude, réalisé sur un faible nombre d'animaux permettant d'arrêter une molécule très précocement, permet de limiter le nombre de molécule entrant en développement et de ce fait, le nombre d'animaux nécessaire lors des études réglementaires (utilisant un plus grand nombre d'animaux par étude).

3407. Un médicament prévu pour soigner les troubles tels que la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie,...une fois dans la circulation sanguine doit pénétrer dans le cerveau afin d'atteindre sa cible. Il est donc nécessaire de mesurer la proportion de la dose qui arrive dans le cerveau.

Pour cela, un test simple de screening est proposé dans lequel une molécule est administrée à des rats ou des souris, et le passage de cette molécule au travers de la barrière hématoencéphalique est vérifiée par le dosage du composé dans le plasma et le cerveau des animaux.

Ce type d'étude nécessitera l'utilisation de 12 rats ou de 12 souris par composé étudié.

Sur 5 ans, un total de 3000 rats et 3000 souris sera utilisé.

Ce type d'études, réalisé sur un faible nombre d'animaux permettant d'arrêter une molécule très précocement, permet de limiter le nombre de molécule entrant en développement et de ce fait, le nombre d'animaux nécessaire lors des études réglementaires (utilisant un plus grand nombre d'animaux par étude).

3408. Ce projet a pour but d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans un médicament dans l'organisme. Il comprend quatre phases, se déroulant successivement :

1. l'absorption dans la circulation sanguine ;
2. la distribution dans tous les tissus et organes;
3. la biotransformation dans le foie ;
4. l'excrétion (élimination) de la substance active.

La quantité de médicament présente dans l'organisme et la durée de sa présence permettent de déterminer les posologies (dose et rythme de prise).

L'utilisation d'un traceur (Carbone 14) est nécessaire pour suivre le produit de biotransformation.

Ces études sont conduites sur des rongeurs (rats ou souris) et nécessite 40 rats ou 64 souris par protocole, ce sont des études incontournables du développement d'un médicament car demandées par les autorités : Guidance OCDE 417

Sur 5 ans, un total de 600 rats et 960 souris sera utilisé.

Le nombre d'animaux utilisé est conforme aux recommandations décrites dans la guidance OCDE 417 de 4 animaux minimum par groupe.

3409. Un médicament peut être éliminé par le foie.

Dans ce cas, le médicament passe dans la bile.

Pour vérifier la vitesse d'élimination de ce médicament par la bile, celle-ci sera collectée sur des rats et analysée afin de rechercher le composé d'intérêt.

Ces études font partie des études de métabolisme recommandées par la guidance OCDE 417. ; Elles nécessitent l'utilisation de 4 animaux par molécule étudiée.

Sur 5 ans, un total de 60 rats sera utilisé.

Le nombre d'animaux utilisé est conforme aux recommandations décrites dans la guidance OCDE 417 de 4 animaux minimum par groupe.

3410. Les phases in vivo et analytique sont conduites pour estimer les niveaux de concentration plasmatique et les paramètres pharmacocinétiques après une administration unique du composé XX par voie orale, intraveineuse ou intrapéritonéale chez le rat ou la souris mâle ou femelle, ou rectale chez le rat.

Les données pharmacocinétiques permettent de déterminer le rythme et les doses à administrer.

Il convient également d'étudier les vitesses d'arrivée et d'élimination pour déterminer les posologies.

Ces études sont des études requises par la réglementation : guidance OCDE 417.

Elles doivent être conduites sur des rongeurs : rats ou souris et nécessite l'utilisation de 24 rats ou 48 souris par molécule étudiée.

Sur 5 ans, un total de 1560 rats et 2880 souris sera utilisé.

Selon la guidance OCDE 427, 4 animaux par groupe sont utilisés

3411. Afin de vérifier laquelle de ces actions est mise en jeu après application du produit sur la peau, il est donc nécessaire de conduire cette étude.

Le but de cette étude est d'évaluer l'absorption dermale et l'excrétion de la radioactivité chez le rat mâle après une application dermale unique du composé 14C-XX.

Cette étude permet de connaître la partie du médicament qui est capable de traverser la peau et d'atteindre la circulation sanguine. Les quantités stockées dans le derme et l'épiderme sont également déterminées.

L'utilisation d'un traceur C14 permet d'avoir une information exhaustive : molécule inchangée et métabolites.

Ces études rentrent dans le cadre d'études réglementaires obligatoires pour le développement de certains composés : Guidance OCDE 427.

Chaque étude d'un composé nécessite l'utilisation de 24 rats conformément à ma guidance citée ci-dessus.

Sur 5 ans, un total de 360 rats souris sera utilisé.

Selon la guidance OCDE 428, 4 animaux par groupe sont utilisés

3412. Mycobacterium ulcerans est l'agent causal d'une maladie cutanée émergente dans les régions tropicales : l'Ulcère de Buruli. Cette bactérie a la particularité de sécréter une toxine lipidique diffusible, la mycolactone, qui lui confère des propriétés ulcérales au niveau local, ainsi que la faculté d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Récemment, l'étude de patients atteints d'Ulcère de Buruli a démontré que leurs défauts d'immunité systémique s'accompagnaient de dérèglements

chroniques du métabolisme glucidique et lipidique, dont la sévérité semble associée à la persistance des lésions au delà de l'élimination des bactéries par traitement antibiotique.

Les cibles moléculaires de la mycolactone ont été récemment identifiées. Il s'agit des protéines de la famille WASP (Wiskott Aldrich Syndrome), des protéines régulatrices du cytosquelette cellulaire dont la stimulation par la mycolactone dans les tissus cutanés explique les propriétés ulcérales de la bactérie. Le rôle de la mycolactone et la contribution des protéines WASP dans les autres manifestations de la maladie restent à élucider.

Ce projet s'articule autour de deux principaux objectifs. Le premier consiste à caractériser le rôle de la production bactérienne de mycolactone dans le dérèglement de l'homéostasie métabolique de l'hôte. Le second vise à étudier l'implication des protéines WASP dans les dysfonctionnements immunitaires et les désordres métaboliques engendrés par l'infection à *M. ulcerans*. Nous estimons à 216 la quantité de souris nécessaire à leur réalisation. Les conclusions de cette étude pourraient permettre d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'Ulcère de Buruli en suggérant des approches complémentaires (nutritionnelles) au traitement antibiotique, et en proposant des solutions thérapeutiques personnalisées. En plus d'améliorer notre connaissance de la pathogénèse de cette maladie infectieuse, elles feront progresser notre compréhension des liens entre inflammation et métabolisme, qui sont au cœur de maladies métaboliques comme le diabète.

3413. Notre projet de recherche vise à utiliser des modèles animaux (*M. musculus*) existants de deux maladies du cortex surrénalien, l'hyperaldostéronisme primaire (HAP) et les tumeurs malignes du cortex surrénalien (TCS). L'HAP est la forme curable d'hypertension artérielle la plus fréquente, qui est diagnostiquée dans environ 10% des patients hypertendus soignées chez de centres spécialisés. Les TCS sont une pathologie rare, mais très dangereuse pour la vie des patients. Notre projet vise à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'origine de ces maladies et à mettre à point des nouveaux outils thérapeutiques. Le nombre de souris estimé qui sera utilisé pour ce projet de recherche est estimé à environ 300.

3414. L'objectif de ce projet est la production de S9 qui est une fraction microsomale servant de système d'activation métabolique, utilisé dans les études *in vitro* réalisées (OCDE 471, 473, 476, 487) pour la génération de données sur les produits à étudier (médicaments, produits chimiques...) avant d'entreprendre des études de toxicologie (plus longues et nécessitant plus d'animaux) obligatoires afin d'établir les dossiers de demande d'autorisation à fournir aux autorités d'enregistrement.

Dans ce protocole, 6 animaux par lot (rat, souris ou hamster) sont soumis à un traitement unique par de l'Aroclor 1254 qui est un inducteur enzymatique. Les organes d'intérêt (foie et/ou rein) sont prélevés 5 jours après le traitement afin de récupérer des fractions microsomales qui serviront de système d'activation enzymatique dans les études *in vitro*.

Les fractions microsomales de rat ou souris sont les plus communément utilisées. Les fractions microsomales de hamster sont utilisées pour des produits ayant un métabolisme particulier (par exemple induction d'amines aromatiques).

Il n'existe pas de texte réglementaire. Mais l'utilisation de S9 est indiquée dans les lignes directrices de la majorité des tests utilisés (OCDE 471, 473, 476, 487) et la préparation est décrite dans de nombreuses publications.

6 animaux par lot sont utilisés, entre 6 et 8 lots sont nécessaires selon les besoins en S9, soit entre 36 et 48 animaux par espèce. 1 fabrication annuelle maximum par espèce. Soit 144 animaux par an au maximum (48 rats, souris et/ou hamster) et 720 animaux sur 5 années d'autorisation de projet (240 rats, souris et/ou hamster) sur 5 années d'autorisation de projet.

Le traitement par l'Aroclor n'induit pas de stress ou de douleur. Après traitement, un suivi comportemental et pondéral des animaux est effectué. Tout animal montrant des signes cliniques modérés ou intenses fait l'objet d'une euthanasie.

Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux.

3415. La maladie d'Alzheimer (MA) est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des facultés cognitives. Au niveau histologique, la maladie se caractérise par la présence dans le cerveau de plaques séniles extracellulaires enrichies en peptide amyloïde ( $A\beta$ ) et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires contenant la protéine Tau hyperphosphorylée. Le modèle de souris triple transgéniques 3xTgAD (PS1M146V, APP<sup>swe</sup>, TauP301) que nous utilisons au laboratoire, mime au mieux la MA puisque ces souris développent non seulement des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires mais aussi des déficits synaptiques et cognitifs.

Récemment nous avons démontré que la dérégulation de l'homéostasie calcique (dérégulation de l'expression et de la fonction du récepteur à la ryanodine du réticulum endoplasmique) joue un rôle clé dans la production du peptide toxique  $A\beta$  *in vitro* et *in vivo* et dans le déficit d'apprentissage et de mémorisation *in vivo* (souris transgéniques modèle de la MA). Des résultats non encore publiés obtenus *in vitro* démontrent l'implication d'une autre protéine de la signalisation calcique du réticulum endoplasmique dans la régulation de la production du peptide toxique  $A\beta$  et suggèrent que cette protéine agirait en boucle dans l'amplification de la MA. L'ensemble de ces résultats nous encourage à étudier l'impact de la modulation de la signalisation calcique du réticulum endoplasmique dans le développement et la progression de la MA. Notre projet scientifique devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la MA et apporter des informations et des précautions importantes pour toutes stratégies thérapeutiques futures. Ce projet de 5 ans sera réalisé, dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), sur un total de 525 souris maximum.

3416. Le projet concerne l'étude du rôle des canaux du type TRP dans la cancérogenèse prostatique, lesquels sont utilisés comme des marqueurs diagnostiques et pronostiques et constituent également des cibles thérapeutiques potentielles car ils

sont relativement faciles d'accès pour les molécules pharmacologiques. Nous avons montré in vitro que parmi les canaux TRP, TRPM8 présente un intérêt tout particulier dans les carcinomes de la prostate car non seulement ce canal voit son expression varier dans les différents stades de la cancérisation mais nos résultats montrent qu'il a également un rôle protecteur empêchant les processus métastatique et angiogénique du cancer. L'ensemble de nos travaux a porté jusqu'à présent sur des modèles in vitro, lignées cellulaires, et des études d'expression dans des tissus humains. Afin de valider l'importance de nos résultats, il est nécessaire que nous progressions dans nos expérimentations vers des approches in vivo. En effet, la pertinence finale de nos résultats obtenus en culture cellulaire ne sera réelle qu'après confirmation du rôle de ces canaux dans le développement de tumeurs cancéreuses chez l'animal.

Le but du protocole mis en œuvre est d'étudier in vivo le pouvoir tumorigène et angiogénique de lignées cellulaires prostatiques surexprimant des gènes codant pour les canaux calciques de type TRP que nous avons montré, par des expériences préalables in vitro, comme étant impliqués dans la croissance cellulaire. Nous avons donc de bonnes raisons de supposer que ces gènes sont impliqués dans la croissance et l'angiogenèse tumorale chez des souris nude (10 animaux par groupe, à 18 lots prévus). Le seul moyen d'étudier le pouvoir protecteur du canal TRPM8 sur la tumorigène et l'angiogénique est de passer des expérimentations in vitro aux études in vivo chez la souris immunodéficiente.

3417. La maladie d'Alzheimer est une maladie dévastatrice, coûteuse, incurable, et dont la prévalence augmente chez les personnes âgées dans le monde. Le peptide beta amyloïde ( $A\beta$ ) qui reste central dans l'étiologie de la pathologie et dont les espèces les plus toxiques sont les formes solubles oligomériques fait l'objet de recherches intensives. De manière importante, la plupart des études cliniques entreprises récemment et qui ciblaient l'activité de la gammasécrétase, une des enzymes intervenant dans la formation de l' $A\beta$ , ont échoué. Il s'avère donc crucial d'identifier de nouvelles cibles qui pourraient conduire à des stratégies thérapeutiques.

Les oligomères d' $A\beta$  ( $A\beta$ os), qui constituent les espèces les plus toxiques, pourraient affecter les capacités d'apprentissage et contribuer aux déficits de la mémoire dans la maladie d'Alzheimer en bloquant ou en induisant une mislocalisation et/ou une déplétion de surface des récepteurs NMDA, impliqués dans la plasticité neuronale. Cependant, les mécanismes par lesquels cette déplétion de surface est induite sont très mal connus. Nous avons récemment montré que la perte d'expression et d'activité de la kinase EphB2, un récepteur qui régule la fonction des récepteurs NMDA, causées par les  $A\beta$ os contribuent aux dysfonctions du réseau neuronal et cognitives chez de souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer. De manière remarquable, la normalisation des niveaux d'expression de la kinase EphB2 dans l'hippocampe chez ces souris restore de manière significative l'activité des récepteurs NMDA et leurs fonctions cognitives liées à la mémoire. Les mécanismes précis et les voies de signalisations par lesquels EphB2 améliore les fonctions cognitives chez ces souris restent à déterminer.

C'est ainsi que nous nous sommes intéressé à la protéine Kalirin-7 qui est impliquée dans la régulation de la formation des épines dendritiques en aval du complexe EphB2/récepteurs NMDA. Notre hypothèse majeure est que la perte de kalirin-7 induite par les oligomères de peptides abeta entraînerait, soit directement via le complexe EphB2/NR1 ou indirectement, la perte des épines dendritiques, les dysfonctionnements du réseau neuronal et les déficits cognitifs. Le projet vise à mieux comprendre le caractère bénéfique de la kinase EphB2 dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer et à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui agissent en synergie ou indépendamment de la voie EphB2. Pour ce projet de 5 ans et dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), 240 souris et 60 rats seront utilisés.

3418. L'objectif de ce protocole est d'analyser le rôle de l'interleukine 33 (IL-33, une cytokine de la famille IL-1 découverte au laboratoire), dans la réponse immunitaire, l'inflammation et le cancer. L'IL-33 semble être un acteur majeur dans des pathologies allergiques comme l'asthme et des pathologies inflammatoires chroniques comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn, et pourrait être un acteur clef de la tumorigénèse liée à l'inflammation.

Récemment, nous avons établi une lignée transgénique murine nous permettant de générer des souris déficientes pour l'IL-33. Nous souhaitons maintenant analyser l'impact de l'élimination de l'IL-33 dans des modèles inflammatoires et des modèles de tumorigénèse. Nous avons obtenu des données préliminaires très intéressantes indiquant que l'IL-33 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de ces pathologies. Ce projet nécessite des expériences chez l'animal car nous devons travailler dans des conditions intégrées permettant l'interaction de plusieurs systèmes cellulaires complexes dont le microenvironnement inflammatoire et tumoral. Ces analyses ne peuvent pas être réalisées à ce jour in vitro. Nous avons choisi d'utiliser la souris comme modèle animal car les outils et les systèmes de transgénèse chez la souris sont très développés. De plus, l'IL-33 est uniquement conservée chez les mammifères et ces études ne peuvent donc pas être conduites dans un autre type d'organisme modèle. A terme, le projet devrait permettre de déterminer si l'IL-33 peut être envisagée comme une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de pathologies inflammatoires et tumorales.

Le projet, avec ses différentes étapes, nécessite l'utilisation de 3095 souris sur 5 années soit 619 souris par an. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au strict minimum afin d'obtenir des résultats significatifs pour répondre aux différentes questions du projet. Il s'agit d'un nombre maximum d'animaux qui pourrait être significativement réduit, si certaines parties du projet se révèlent négatives. Ainsi, certaines parties des procédures expérimentales ne seront réalisées que si les premières parties donnent des résultats positifs. De la même façon, les expériences en triplicat ne seront réalisées que si les premières expériences donnent des résultats positifs.

Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommage durables que pourraient subir les animaux. L'ensemble des procédures sera réalisée sous anesthésie volatile pour réduire l'angoisse des animaux. Le suivi des animaux après chaque procédure sera journalier avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint.

3419. Ce projet a pour but de mieux comprendre le rôle des vaisseaux sanguins dans le cancer. Les vaisseaux sanguins contribuent à la croissance des tumeurs en fournissant notamment l'oxygène et les éléments nutritifs dont les cellules cancéreuses ont besoin pour survivre et se multiplier. Jusqu'à présent, leur abondance était donc considérée de mauvais pronostic. Cependant, tous les vaisseaux sanguins ne sont pas équivalents et certains vaisseaux très spécifiques, les vaisseaux HEV, combattent le cancer. Ainsi, dans les tumeurs du sein, une grande densité de vaisseaux HEV est associée à une survie plus longue des patientes. Il semble que ces vaisseaux 'anti-cancer' luttent contre la progression tumorale en favorisant l'accès aux tumeurs des lymphocytes 'tueurs', capables de détruire les cellules cancéreuses.

Un objectif majeur du présent projet est de mieux comprendre l'origine des vaisseaux HEV et leur rôle dans les tumeurs afin de pouvoir agir sur ces vaisseaux dans le cadre de nouvelles stratégies de thérapie anti-cancéreuse.

Les cellules des vaisseaux HEV sont remarquablement plastiques et perdent rapidement leurs caractéristiques spécialisées en dehors de leur tissu d'origine. L'étude des vaisseaux HEV dans les tumeurs doit donc être réalisée in vivo, en utilisant des modèles animaux. Les procédures expérimentales ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Les modèles de tumeur pertinents qui ont été identifiés sont des modèles murins. De plus, l'existence de souris transgéniques déficientes en certaines populations immunitaires ou permettant l'élimination in vivo de certaines populations immunitaires, permettra de déterminer le rôle de ces différentes populations dans le développement et la fonction des vaisseaux HEV de tumeur. Seule l'espèce murine offre ces modèles transgéniques.

Le projet, avec ses différentes étapes, nécessite l'utilisation de 738 souris sur 3 années, soit 246 souris par an. Le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Le partage d'organes ou de tissus pourra se faire entre les différentes parties du projet pour réduire encore l'effectif. Le nombre d'animaux donné est fixé sur le maximum nécessaire. En effet, si les premières parties du projet se révèlent négatives, le nombre pourrait être réduit.

Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse ou dommage durables que pourraient subir les animaux. L'ensemble des procédures sera réalisée sous anesthésie volatile pour réduire l'angoisse des animaux. Le suivi des animaux après chaque procédure sera journalier (masse tumorale, poids de l'animal, aspect extérieur) avec interruption de l'expérimentation si l'un des critères d'arrêt est atteint.

3420. Le système immunitaire est capable d'éliminer les cellules tumorales apparaissant au cours de la vie d'un individu. Cependant, de nombreuses études ont démontré la capacité des tumeurs à façonner un environnement immunosuppresseur leur permettant d'échapper aux réponses immunitaires.

Nous utilisons une stratégie vaccinale basée sur la présentation d'antigènes tumoraux au système immunitaire par un nouveau vecteur ciblant les cellules dendritiques. Un vaccin, aujourd'hui en essai clinique, contenant l'oncoprotéine E7 du papillomavirus humain, permet l'éradication chez la souris de tumeurs établies, dérivées de cellules épithéliales de poumon murin et exprimant les oncoprotéines E6 et E7 du HPV 16.

Cependant, chez la souris, l'efficacité thérapeutique du vaccin diminue progressivement au fur et à mesure de la croissance tumorale. Nous avons observé dans ce modèle une accumulation de lymphocytes T régulateurs et de cellules myéloïdes suppressives dans le microenvironnement tumoral qui pourraient être responsables de cette perte d'activité thérapeutique.

Nous avons récemment mis en évidence une accumulation de lymphocytes B dans le ganglion drainant la tumeur des souris porteuses des tumeurs. Il est aujourd'hui bien établi que les lymphocytes B sont capables de supprimer la réponse inflammatoire lors de maladies auto-immunes. Cette activité régulatrice des lymphocytes B est due notamment à leur capacité à sécréter de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire.

L'objectif général du projet est d'étudier le rôle des lymphocytes B dans l'immunité antitumorale. Il est organisé autour de trois sous-objectifs :

- Analyse (i) des populations lymphoïdes recrutées au sein de l'environnement tumoral, et dans les organes lymphoïdes chez les souris porteuses de la tumeur, à différents stades de la croissance tumorale. (ii) des sous-populations de lymphocytes B recrutés dans ces organes ou dans la tumeur.

- Analyse du rôle fonctionnel des lymphocytes B recrutés chez les souris porteuses de la tumeur.

- Etude in vivo du rôle des lymphocytes B sur l'immunité anti-tumorale, grâce à un modèle de souris génétiquement déficientes en lymphocytes B. Ce modèle murin nous permettra d'analyser le rôle de ces cellules dans un contexte physiologique et d'étudier leur implication dans les interactions hôte-tumeurs, qui ne peuvent être abordées par des procédures alternatives in vitro.

Environ 2000 animaux 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.

Ce projet occasionnera quelques effets néfastes pour la souris dus au développement de tumeurs. Cependant, l'étude sur un modèle animal est absolument nécessaire car il est impossible de recréer in vitro un environnement tumoral. Le niveau de sévérité attendu est modéré et les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Tous les protocoles seront établis afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées et en définissant des points limites les plus précoces possibles. 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.

3421. En ayant recours à des souris de laboratoire chez lesquelles se développent la tumeur TC-1 exprimant les deux protéines E6 et E7 oncogènes codées par le papillomavirus humain (HPV) 16, deux génotypes de virus impliqués dans les cancers du col de l'utérus, il a été possible de mettre au point un vaccin thérapeutique stimulant des réponses spécifiques de l'oncoprotéine E7 du HPV 16. Ce vaccin est basé sur un nouveau vecteur qui permet de délivrer l'antigène vaccinal aux cellules dendritiques et a démontré sa bonne tolérance et son immunogénicité dans un essai de Phase I. Administré à des souris porteuse de la tumeur TC-1, ce vaccin a permis l'éradication complète de cette tumeur. Cependant, quand il est administré à des souris chez lesquelles le développement de la tumeur TC-1 est avancé, ce vaccin thérapeutique n'est plus efficace. La forte accumulation de lymphocytes T (LTs) CD4+ Foxp3+ régulateurs (Tregs) observée au sein de ces tumeurs pourrait être un des mécanismes responsables de cet échec d'une thérapie tardive. En effet, l'accumulation des Tregs pourrait contribuer à la création du microenvironnement immunosuppresseur observé dans les cancers humains et dans divers modèles murins de cancers.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier le rôle des Tregs au sein du tissu tumoral ainsi que leur implication dans l'échec de la vaccination mise en oeuvre tardivement. Une étude cherchant à identifier les mécanismes responsables du recrutement de ces Tregs au sein du tissu tumoral sera également réalisée. Enfin, nous analyserons le rôle de la rapamycine (molécule utilisée chez l'homme pour le traitement de certains cancers et impliquée également dans la différenciation des lymphocytes T CD8+ et CD4+) dans le recrutement et l'activation des Tregs au sein de la tumeur, ainsi que sa capacité à améliorer la réponse antitumorale après vaccination thérapeutique. Le recours à différentes lignées de souris - dont les souris Foxp3-GFP (chez lesquelles l'expression de la GFP est contrôlée par le promoteur du gène foxp3, permettant ainsi d'identifier et d'isoler facilement les Tregs), devrait nous permettre de mettre au point, de valider et de proposer des stratégies pour améliorer l'efficacité du vaccin en bloquant ou en réduisant l'accumulation des Tregs au sein des tumeurs. Le fait que les propriétés des lymphocytes Tregs murins et humains soient très comparables justifie pleinement l'utilisation de ce modèle animal pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la croissance des tumeurs humaines.

Pour atteindre les objectifs du projet, nous estimons à 1000 par an, le nombre de souris auxquelles nous aurons recours. Cette estimation repose sur la considération de plusieurs paramètres - ceux intrinsèques à la robustesse statistique et également au fait que la population de lymphocytes Treg est faiblement représentée dans les tumeurs étudiées. Tous les protocoles seront établis afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées et en définissant des points limites les plus précoces possibles. L'ensemble des résultats de ce projet permettra d'apporter des informations essentielles pour le développement de traitements des cancers chez l'homme.

3422. L'amyotrophie spinale (SMA) est une maladie neurodégénérative autosomique récessive caractérisée par une dégénérescence des motoneurones spinaux et une atrophie musculaire généralisée. Des mutations, délétions ou conversions dans le gène « survival of motor neuron 1 » (SMN1) sont responsables d'une diminution de l'expression de la protéine SMN à l'origine de la perte des motoneurones spinaux.

La SMA est divisée en 4 formes cliniques selon l'âge d'apparition des symptômes et le degré de sévérité de l'atteinte motrice : les types I et II sont des formes infantiles respectivement sévère et intermédiaire, le type III est une forme juvénile modérée et le type IV une forme adulte. La sévérité de la maladie est inversement proportionnelle au niveau d'expression de la protéine SMN dans les motoneurones. La SMA représente une des causes génétiques de mort infantile la plus fréquente et aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. Cependant depuis la découverte du gène responsable de la maladie, de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension de la pathogénie, en particulier grâce au développement de modèles murins.

La thérapie génique visant à remplacer le gène défectueux SMN et augmenter ainsi le niveau d'expression de la protéine dans la moelle épinière apparaît comme une approche thérapeutique prometteuse dont le potentiel peut être évalué grâce aux modèles murins disponibles.

Des études récentes ont mis en évidence l'efficacité du transfert de gène dans les motoneurones murins en utilisant un vecteur recombinant dérivé du virus adénoassocié de sérotype 9 (AAV9). Deux voies d'administration ont été bien étudiées : la voie intramusculaire et la voie intraveineuse. Bien que ces études aient montré que la surexpression de SMN dans la moelle épinière des souris malades permettaient une survie des motoneurones et donc de manière plus générale une survie prolongée des animaux, leur application en clinique paraît plus problématique. L'abord intramusculaire nécessiterait plusieurs injections afin de cibler l'ensemble de la moelle épinière chez l'enfant, quant à la voie intraveineuse bien que permettant une transduction des motoneurones, elle entraîne également une expression du génome viral dans les organes périphériques non ciblés.

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de prouver l'efficacité thérapeutique de la surexpression de SMN dans des modèles murins SMA par une administration de vecteur AAV restreinte au système nerveux central et transposable en clinique. Un total de 240 souris sera nécessaire pour valider cette étude.

3423. Les inflammations de la cornée dues aux parasites acanthamibes sont des pathologies rares mais en nette augmentation depuis une dizaine d'années. Cette augmentation est sans doute liée au nombre croissant de porteurs de lentilles de contact, chez qui sont diagnostiquées plus de 85% de ces infections par les acanthamibes libres devenues pathogènes opportunistes de l'Homme. La pathologie est souvent grave car les symptômes sont peu spécifiques de l'agent pathogène, et les techniques de diagnostic actuelles sont souvent lentes et fastidieuses, entraînant un retard à l'application d'un traitement approprié. Les traitements existants à l'heure actuelle sont certes efficaces mais présentent des effets secondaires non négligeables (cytotoxicité) et une efficacité moyenne qui rendent le traitement lourd. L'objectif principal de ce programme est une étude

pré-clinique en vue d'établir la concentration d'un agent antimicrobien, le polyhexaméthylène biguanide, efficace pour le traitement des inflammations de la cornée dues aux acanthamibes et de déterminer si la réponse induite par les différentes concentrations du polyhexaméthylène biguanide (0,02%; 0,04%; 0,06%) seul sont comparables à celle qui sont obtenues en utilisant la thérapie de combinaison du polyhexaméthylène biguanide 0,02% avec un autre agent microbien, l'iséthionate de propamide dont l'efficacité a été précédemment prouvée. Conformément aux principes « 3R » (« remplacement, réduction, raffinement »), et dans la mesure où aucun modèle non vivant n'est recevable en vue d'une transposition des résultats chez l'Homme, cette étude utilisera un nombre minimal d'animaux en supprimant ou soulageant s'il y a lieu inconfort, douleur, détresse et/ou angoisse des animaux. Afin de tester l'efficacité de différentes concentrations d'une formulation exclusive du polyhexaméthylène biguanide, un modèle animal précédemment décrit sera utilisé. Des rats infectés au niveau de l'oeil par le parasite seront divisés en groupes de 7 animaux et traités par voie topique par différentes concentrations d'agent(s) antimicrobien(s). Une observation du tissu cornéen permettra de décrire les lésions histologiques et de détecter la présence de parasites. Dans ce programme, conformément à la réglementation en vigueur, les méthodes appropriées seront utilisées pour réduire au minimum toute angoisse/douleur chez les animaux avec une observation régulière (dont l'échelle d'expression faciale). Un traitement antidouleur sera appliqué si cela est nécessaire et, en cas d'échec, les rats devront être euthanasiés.

Résultats attendus : Il est attendu de cette étude une évaluation de l'efficacité du polyhexaméthylène biguanide dans un modèle d'infection de la cornée par les acanthamibes chez le rat.

De même, il est attendu une contribution à des recommandations visant à améliorer l'approche clinique, et le pronostic des infections cornéennes humaines dues aux acanthamibes, fondées sur un traitement d'efficacité et d'innocuité prouvées, spécifiquement via l'identification des formulations optimales de l'agent pharmacologique, polyhexaméthylène biguanide.

3424. La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont des arboviroses dont beaucoup sont des zoonoses. Les arboviroses d'importance médicale qui sont plus précisément liées à ce projet sont la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise, le West Nile, la dengue, le Chikungunya et la fièvre de la Vallée du Rift.

Les arbovirus sont des pathogènes remarquables en ce sens qu'ils sont transmis à des hôtes vertébrés lors de piqûres par des arthropodes hématophages (désignés comme vecteurs). Ce mode de transmission combine les trois composantes essentielles : virus, vecteur, et vertébrés.

La capacité d'un arbovirus à disséminer parmi une population est dépendante de plusieurs facteurs qui sont propres à chacune des trois composantes de la transmission biologique : le(s) vecteur(s) invertébré(s), le(s) hôte(s) vertébré(s) et la souche virale infectante. Ils doivent être identifiés et caractérisés dans le but de comprendre la physiopathologie de l'infection virale et proposer des stratégies de lutte qui soient efficaces contre la maladie.

En l'absence de systèmes *in vitro* capables de reproduire la maladie humaine, l'étude des facteurs impliqués dans la transmission virale du vecteur vers l'hôte vertébré et le pouvoir pathogène du virus infectant nécessite l'utilisation de modèles animaux. Les analyses pratiquées impliquent d'abord la compréhension du mode de transmission du virus lors de la piqûre du moustique y compris le rôle de la salive d'invertébré dans l'élaboration de la réponse immunitaire qui est induite en réponse à l'introduction du pathogène au niveau du derme. Elles se poursuivent par la mise en évidence de facteurs viraux qui sont impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire antivirale de l'hôte.

L'infection expérimentale chez la souris commune *Mus musculus*, offre des possibilités d'étude exploratoire d'une part sur la transmission biologique du virus et d'autre part, vers la compréhension des mécanismes de pathogénicité virale.

La réalisation d'un essai d'infection virale implique un effectif total de 70 souris réparties par groupe de 5 individus qui sont anesthésiés au préalable avant l'injection du virus directement par la voie intrapéritonéale, intracérébrale ou intradermique ou suite à la piqûre d'un moustique vecteur du pathogène considéré. Les souris infectées manifestant des signes d'inconfort, de stress ou de douleur seront surveillées très fréquemment et euthanasiées dès l'apparition des points limites qui ont été définis. Sur la période de 5 années, il est prévu qu'environ 2550 souris soient éprouvées pour leur sensibilité à l'infection par les arbovirus et/ou testées pour leur réactivité immunologique vis à vis des antigènes viraux natifs ou recombinés. Cette méthode d'exploration reste indispensable à l'étude des arbovirus d'importance médicale avec la mise au point de prophylaxie (vaccins par exemple), d'outils de diagnostic (sérologie par exemple) et de traitements anti-viraux (molécules inhibitrices des arbovirus par exemple) efficaces au bénéfice des populations humaines concernées.

3425. Des mutations du gène Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) sont à l'origine de deux pathologies humaines: le Syndrome de l'X Fragile (FXS) et le Syndrome FXTAS (Fragile X associated Tremor-Ataxia Syndrome). Le FXS, causé par l'inactivation du gène FMR1, représente la forme la plus fréquente de retard mental héréditaire. Le FXTAS est lié à une surexpression du gène FMR1 (2- 8 fois) entraînant une neurodégénération et des troubles neurodéveloppementales. Pour comprendre le rôle de la protéine FMRP, codée par le gène FMR1, et la physiopathologie de ces deux syndromes, nous utiliserons des modèles murins. L'absence de lignées cellulaires permettant d'approcher la complexité neuronale rend l'utilisation des animaux inévitable pour notre travail. En effet, la souris possède un gène homologue à FMR1 dont la manipulation par transgénèse a permis de développer les modèles des syndromes décrits: la souris *Fmr1-KO* n'exprimant pas le gène *Fmr1* (FXS) et la souris *Fmr1-KI* qui surexprime ce gène (FXTAS).

De plus le rôle de *Cyfp1* et *Cyfp2* (interacteurs de FMRP) dans le contexte du FXS sera étudiés. Nous sommes en train de générer des animaux *Floxed-Cyfp1* et *Floxed-Cyfp2*, les croiser avec les transgéniques exprimant le gène *Cre* sous le contrôle du promoteur de la *CAMKII*, pour obtenir le Knock-out spécifique du cerveau :*FBI-CY1* (Forebrain-Inactivated-Cyfp1) et *FBI-CY2* (Forebrain- Inactivated-Cyfp2) respectivement. Nous avons étudié *dCYFIP* en *Drosophile*, toutefois la présence d'un seul

gène dCYFIP (chez la souris comme chez l'homme deux paralogues sont présents) nous oblige à passer à un modèle plus adapté. De plus, nous analyserons à l'échelle de l'organisme l'efficacité de molécules thérapeutiques pour le FXS, rendant l'utilisation du modèle animal indispensable.

En garantissant une puissance statistique suffisante tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés, nous prévoyons:

- maintien des 6 colonies (Fmr1-KO, Fmr1-KI, Fmr1-WT, FLOX-CY, FLOXCY2, CAMKII-Cre): un minimum de 20 femelles et 5 mâles par génotype soit 150 animaux.
- collection de plasma et d'échantillons de cerveaux (préparation de protéines, ARNm) de 5 animaux de 9 génotypes (Fmr1-KO, Fmr1-KI, WT-FMR11, FLOXCY1, FBI-CY1; FLOXCY2 ; FBI-CY2 ; Fmr1-KO/FBI-CY1 et Fmr1-KO/FBI-CY2) à 0, 12, 28 jours, et 2, 3, 6, 12 et 18 mois, soit 360 animaux. Des préparations de polyribosomes (5) et synaptosomes (5) seront réalisées à partir de 7 cerveaux/préparation des mêmes 9 génotypes (630 animaux).
- de tester l'efficacité de deux molécules thérapeutiques sur un minimum de 15 animaux Fmr1-KO et Fmr1-WT, traités versus non traités, soit 120 animaux.
- Études du système de contrôle de la glycémie chez FXS : 40 animaux
- Cultures primaires de neurones 3 génotypes (Fmr1-KO, Fmr1-KI, WT) et cellules gliales de 2 génotypes (Fmr1-KO, WT) soit 1768 animaux.
- Collections des embryons Fmr1-KO et Fmr1-WT aux stades E10.5, E12.5, E14.5, E16.5 et E18.5, soit 6 femelles gestantes pour chaque stade en moyen 6 embryons/portée, soit 210 animaux.

Dans la mesure du possible, nous optimiserons la collecte d'échantillons afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés (récupération du cerveau des femelles gestantes sacrifiées, mêmes contrôles...).

3426. La reconnaissance de molécules d'intérêt biologique par des anticorps spécifiques permet de mettre en évidence leur présence, d'en estimer la quantité, de les localiser dans des cellules ou des tissus, d'aider à les purifier, d'aider à comprendre leur structure, de neutraliser leur activité etc. Notre mission est de produire ces anticorps spécifiques en profitant de la capacité des souris à les produire lorsque ces molécules d'intérêt biologique leur sont injectées. Pour ce faire nous isolons les cellules productrices de ces anticorps et les mettons en culture pour les multiplier et pour récolter en quantité suffisante et purifier les anticorps qu'elles produisent. A titre d'exemple notre structure a permis de produire, dans les années 90, des anticorps dirigés contre les virus du SIDA qui ont été utilisés en recherche pure et dans la mise au point de test de diagnostic; plus récemment nous avons obtenu des anticorps dirigés contre des bactéries pathogènes qui ont permis de mettre au point des outils de détection robustes et peu chers, utilisés dans les pays en voie de développement. Le recours à un processus d'immunisation d'animaux, en l'occurrence de souris, est aujourd'hui obligatoire puisque nous n'avons pas encore réussi à trouver de technique alternative performante pour nous en dispenser. Nous réalisons une douzaine de projets par an pour isoler des anticorps reconnaissant aussi bien des protéines ou éléments constitutifs de virus, de bactéries, de parasites que des protéines impliqués dans des pathologies telles que des surdités ou des cancers. Même si il nous est malheureusement impossible de ne pas sacrifier les souris pour en isoler les cellules productrices d'anticorps, notre but est d'en réduire en maximum le nombre en rationalisant et rendant plus performantes certaines étapes du processus. L'émergence de règles éthiques visant à préserver autant que possible le bien être des animaux nous amène à adapter nos procédures pour les prendre en compte : l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiants à toutes les étapes où elles sont nécessaires, la surveillance renforcée des animaux, le respect des procédures d'intervention technique recommandées par les autorités seront mises en place. Ce projet nécessitera l'utilisation d'un total maximal de 500 souris sur 5 ans, dont 200 subiront une procédure légère et les autres une procédure jugée sévère. Dans le même temps seront développées des techniques permettant à terme de ne plus mettre en œuvre la seconde procédure.

3427. Les maladies génétiques, qui affectent l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), entraînent des pertes sévères et rapides de la vision conduisant jusque la cécité. La perte des photorécepteurs est due au mauvais fonctionnement ou à la dégénérescence de cet EPR. A leur actuelle, il n'existe pas de traitement curatif pour ces maladies.

Le protocole est proposé dans le cadre de l'évaluation du bénéfice fonctionnel et de la sécurité d'un produit de thérapie cellulaire (PTC). Ce PTC est composé de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dérivées de cellules souches embryonnaires humaines (hES), et d'une membrane amniotique humaine servant de support.

La partie du projet visée par cette demande d'autorisation consiste à greffer dans l'espace sous-rétinien d'un modèle de rat NUDE des cellules de l'EPR dérivées des hES (qui composent le PTC) pour vérifier l'innocuité du produit de thérapie cellulaire vis-à-vis du risque tératogène. En effet, le risque majeur de l'utilisation de produits cellulaires issus des cellules hES est le risque de formation de tératomes (tumeurs bénignes).

Cette étude préclinique sur modèles animaux est requise pour une demande d'essai clinique de phase I/II chez l'homme en cas d'innocuité démontrée in vivo. Au total, 180 rats NUDE (immunodéficients) seront nécessaires pour cette étude.

3428. Un vaccin pour être efficace doit être capable d'induire une réponse immunitaire spécifique.

Les stratégies vaccinales testées dans cette étude ciblent des agents pathogènes infectants notamment les muqueuses de l'organisme. Il est donc important d'évaluer si elles sont capables d'induire une réponse immunitaire à ce niveau ainsi que dans tout l'organisme. Cependant la faible efficacité des stratégies vaccinales actuelles nécessite l'utilisation de molécules facilitant l'induction de réponses immunitaires (adjuvant). De tels adjuvants doivent être capables de faciliter l'accès du vaccin au système immunitaire.

Ce protocole vise à étudier de nouveaux adjuvants de vaccins capables d'induire une réponse immunitaire périphérique et muqueuse chez la souris.

Dans ce but, nous souhaitons étudier l'efficacité induite par une vaccination chez la souris de nouvelles molécules adjuvantes après administration par voie sous cutanée, intradermique et intramusculaire. Ce projet portera sur 315 souris (7 groupes de 5 animaux immunisés par 3 voies différentes sur 3 essais).

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toute souffrance inutile à l'animal et de le sortir le plus rapidement possible de la manipulation. Les prélèvements sanguins et la mise à mort des animaux s'effectueront de façon à limiter au maximum le stress et la douleur.

3429. Les muqueuses représentent la voie principale d'entrée de la majorité des agents pathogènes. La vaccination muqueuse permet l'induction de réponses immunitaires au niveau de ces muqueuses mais reste à ce jour inefficace.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie de vaccination basée sur un ciblage vaccinal des muqueuses à l'aide d'anticorps. Nous souhaitons en particulier étudier les réponses immunitaires induites par cette stratégie vaccinale chez la souris et le lapin.

Ces études ne peuvent se faire in vitro car le but est de suivre l'activation physiologique du système immunitaire de l'animal après immunisation par voie orale ou nasale. Les modèles murin et lapin sont les modèles de référence pour évaluer la réponse humorale. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique

Le nombre total de souris a été fixé à 210 souris (5 groupes de 6 souris par procédure) et 30 lapins (3 groupes de 3 lapins + les contrôles) soit au maximum 240 animaux au total.

Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toute souffrance inutile à l'animal et de le sortir le plus rapidement possible de la manipulation. Les prélèvements sanguins et la mise à mort des animaux s'effectueront de façon à limiter au maximum le stress et la douleur.

3430. Un nombre important d'études chez l'homme montre qu'il existe un lien étroit entre le retard de croissance chez l'enfant et le risque de développer un Diabète de type 2 (DT2) à l'âge adulte. Afin de mieux comprendre les mécanismes de cette « programmation » nous utilisons chez le rat un modèle de retard de croissance bien documenté (régime LP : low protein) durant la gestation et la lactation. Nous avons constaté chez le fœtus des altérations localisées au niveau du foie, du pancréas, du muscle ainsi que du tissu adipeux (blanc et brun). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués soient encore méconnus, nos résultats préliminaires suggèrent que les microARNs (miARNs) pourraient être impliqués. En effet, nous avons pu montrer que chez l'embryon le profil d'expression des miARNs est altéré dans le foie et le pancréas des animaux présentant un retard de croissance. Cette étude doit être confirmée et étendue aux autres tissus impliqués (muscle, tissu adipeux blanc et brun). Nous évaluerons également si les profils des miARNs varient dans ces tissus avec l'apparition de la pathologie. En effet, nous rechercherons ces altérations des miARNs chez les animaux LP (low protein) à différents âges (3, 12 et 18 mois) et suivrons en parallèle l'apparition du diabète de type 2. Dans le but d'accélérer l'apparition du phénotype la progéniture sera nourrie dès le sevrage (4 semaines) soit avec un régime standard soit avec riche en graisse (42% de matière grasse). En effet, l'obésité est un autre facteur environnemental associé au développement du diabète de type 2 (90% des cas).

Pour finir, l'utilisation de cellules primaires obtenues de nos animaux Contrôles (C) et LP (îlots pancréatiques, hépatocytes fraction stroma-vasculaire) nous permettra d'établir l'implication précise de nos miARNs candidats dans la mise en place du diabète de type 2 (DT2). Cette pathologie combine une résistance à l'insuline et une sécrétion d'insuline altérée).

Nombre total d'animaux :

Au total notre projet nécessitera 32 portées. L'ensemble des descendants mâles sera utilisé soit 96 pour la procédure 2 et environ 50 fœtus pour la procédure 1.

Soit un nombre total maximal prévu pour ce projet, incluant les nouveau-nés femelles sacrifiées, les animaux reproducteurs et les femelles gestantes sacrifiées estimé à :

32 femelles gestantes (Groupe 1 = 12 + groupe 2 = 20 ) + 20 portées à 10 petits en moyenne (mâles et femelles) + 10 mâles reproducteurs = 242 rats

3431. Ces études ont pour objet de rechercher les effets que provoquent des environnements particuliers constitués notamment par : de la pression, des gaz inertes (narcose aux gaz inertes, azote, argon, hélium), de l'hyperoxie normobare ou hyperbare, sur les interactions qui existent entre différents systèmes de neurotransmission au sein de certaines structures du système nerveux central, sur le rôle des récepteurs aux neurotransmetteurs et les modifications qu'elles entraînent.

Elles seront réalisées sur des rats de laboratoire (Sprague Dawley) dont le système nerveux central est bien connu à raison de cent soixante deux à cent soixante trois rats par année (total 814 rats pour les cinq ans), bioinstrumentés, éveillés, libres de mouvements . Ces animaux seront exposés à l'augmentation de pression de mélange respiratoire contenant des gaz inertes ou de l'oxygène pur à l'intérieur d'un caisson hyperbare. Des substances antagonistes ou agonistes de certains neurorécepteurs seront administrées soit dans les ventricules latéraux du cerveau, soit focalement dans certaines structures sous corticales. Les neurotransmetteurs étudiés seront soit recueillis par sonde de microdialyse et ensuite dosés par HPLC, soit dosés in vivo par voltamétrie. Les animaux qui ont terminé le cycle expérimental sont euthanasiés. Les études sur les interactions de la neurotransmission acide aminergique et monoaminergique au niveau des voies nigro - striées ou striato - pallidales et les

modifications entraînées par la narcose aux gaz inertes, la pression ou l'hyperoxie, nécessitent l'implantation sous anesthésie générale et sous contrôle stéréotaxique

-de canules pour l'injection de substances pharmacologiques soit dans l'un ou l'autre des compartiments de la substance noire, soit dans les ventricules latéraux;

-d'électrodes en fibre de carbone permettant de mesurer la libération de certains neurotransmetteurs au niveau du striatum ou du noyau accumbens;

-de sondes de microdialyse permettant de recueillir des dialysats par exemple au niveau du striatum;

-d'électrodes pour le recueil des activités électrophysiologiques au niveau du striatum ou du globus pallidus.

A l'issue des interventions chirurgicales, les animaux seront mis en surveillance pendant huit jours. Ils recevront tous les soins nécessaires pour palier aux éventuelles conséquences de l'intervention chirurgicale.

Quatre études sont envisagées.

1 - Etude de l'interaction acides aminés et monoamines au niveau de la voie nigro-striée. Effets des gaz inertes et de la pression

2 Etude neurochimique des effets de l'hyperoxie ou de l'hypoxie sur le système nerveux central.

3 Etude des interactions des neurotransmissions acides aminés et monoamines au niveau de la voie striato pallidale. Effets des gaz inertes et de la pression.

4 Etude de l'hyperbarie et ou hyperoxie sur l'expression des récepteurs A2A de l'adénosine et sur les protéines cFos et cJun.

Des tests statistiques non paramétriques seront utilisés afin de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement exploitables.

3432. Compte tenu de l'intérêt agronomique de l'espèce ovine (productions de lait et de viande), de nombreuses études ont été menées afin de décrire et comprendre les comportements de reproduction, maternel, de relation et émotionnels. L'implication de systèmes de régulation endocriniens et neuronaux a été démontrée faisant de l'ovine un modèle d'intérêt pour la compréhension des mécanismes neurobiologiques régulant ces comportements.

L'étude de ces mécanismes repose souvent sur l'utilisation de méthodes pharmacologiques et/ou immunohistochimiques qui sont invasives et qui nécessitent l'euthanasie systématique des animaux.

La disponibilité de nouvelles techniques d'imagerie comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est un atout majeur pour l'étude de la neurobiologie, notamment parce qu'elles permettent d'étudier l'encéphale dans sa globalité, de mener des études dans le temps (un même animal peut être étudié sur une longue période de sa vie), tout en étant moins invasives. Toutefois, peu d'outils d'analyse et de traitement d'images, spécifiques de ces modèles animaux existent, ce qui limite le développement de ces nouvelles méthodes.

Le projet soumis pour autorisation, a pour objectifs de créer ces outils dédiés à l'ovine, plus particulièrement à la brebis adulte. Nous proposons ainsi la création d'un atlas probabiliste, utile pour les études statistiques, et la création d'un atlas anatomique, utile pour le repérage des structures cérébrales. Ces outils seront testés et validés sur des images fonctionnelles obtenues par IRM de perfusion (marquage de spins artériels et injection de gadolinium).

La création de l'atlas probabiliste repose sur l'acquisition d'IRM sur une vingtaine d'individus au total, 3 à 4 individus seront choisis comme références dans ce groupe afin de réaliser l'atlas anatomique. Ces effectifs ont été définis en accord avec la littérature pour proposer des outils pertinents en vue de favoriser l'utilisation de méthodes d'imagerie peu invasives pour l'étude du système nerveux central.

Dans ce projet, la règle des 3 R est appliquée en limitant le nombre d'individus sans nuire à l'objectif final de création d'un atlas probabiliste qui doit rendre compte de la variabilité interindividuelle. Le nombre d'individus nécessaires pour l'atlas anatomique ne peut être inférieur à 2 afin d'identifier les structures dans deux plans de coupe, et compte tenu des aléas expérimentaux liés à l'histologie, le nombre maximum d'individus a été limité à 4. La notion de raffinement est appliquée puisque les procédures expérimentales sont réalisées pour minimiser les conséquences douloureuses. Enfin, compte tenu de l'objectif de création d'atlas, il est indispensable de travailler sur le modèle animal de références pour l'étude des mécanismes précédemment cités, soit la brebis adulte.

3433. Les quinoléïnes sont des principes actifs dont nous avons montré l'efficacité leishmanicide tant in vivo qu'in vitro. Le but de ce travail est d'améliorer leur efficacité thérapeutique pour la création d'une nouvelle classe de médicaments leishmanicides. Les organes atteints par le parasite seront ciblés à l'aide de liposomes furtifs ou non chargés de ces principes actifs. L'efficacité des principes actifs vectorisés sera vérifiée sur un modèle de leishmaniose viscérale chez la souris et sur lequel ont été découverts l'efficacité leishmanicide de la Fungizone® (amphotéricine B déoxycholate), de l'AmBisome® (amphotéricine B) et de l'Impavido® (miltéfosine) qui sont actuellement employés pour traiter les malades. Nous prévoyons 360 souris balb/c femelles sur une période de deux ans. Les souris employées seront des balb/c car elles peuvent être infectées par *Leishmania donovani*. Les produits sont évalués par lot de dix souris pour avoir des résultats statistiquement interprétables par des tests non paramétriques pour réduire le nombre d'animaux. Ce modèle de leishmaniose chez la souris reproduit la maladie humaine. La maladie est indolore chez l'Homme et chez la souris. Les essais in vitro ont montré l'efficacité du concept et nous voulons vérifier l'activité in vivo. Les expériences nécessitent 360 souris.

En cas d'effet indésirable du traitement (comportement anormal de l'animal ou perte de poids), l'animal traité est immédiatement euthanasié.

Résultats attendus. Nous espérons que les formulations permettront dans le futur une meilleure prise en charge des malades.

3434. La principale mission du laboratoire est de développer et mettre sur le marché de nouvelles molécules (protéines humaines) à usage thérapeutique dans le domaine de l'immunologie, les soins intensifs et l'hémostase. Les nouvelles molécules doivent être caractérisées in vitro et in vivo (chez l'animal puis chez l'homme) afin de démontrer leurs efficacités et comprendre leur mécanismes d'action, d'étudier leurs propriétés pharmacocinétiques et d'évaluer leurs toxicités. Au cours de ces caractérisations, des nouveaux dosages avec des réactifs spécifiques à la nouvelle molécule thérapeutique en développement doivent être générés. Ces nouveaux dosages sont par exemple, le dosage de la molécule dans le plasma animal ou humain, le dosage des anticorps anti-molécule dans le plasma animal ou humain, le dosage de l'activité fonctionnelle de la molécule in vitro. Les anticorps dirigés spécifiquement contre la molécule thérapeutique sont souvent de très bon réactifs et sont communément utilisés dans ces applications et leur production requiert obligatoirement l'immunisation d'animaux.

L'immunisation consiste à administrer par voie sous-cutanée la protéine contre laquelle des anticorps veulent être générés. Cette administration se fait en présence d'adjuvant qui permet d'amplifier la réponse immunitaire et ainsi générée une réponse anticorps plus importante. Ces administrations sont répétées (rappel) afin d'amplifier (augmentation du titre en anticorps) et d'augmenter la spécificité (affinité) de la réponse immunitaire. Trois rappels sont au minimum effectués. L'objectif final est l'obtention d'un immun-sérum riche en anticorps spécifique contre la molécule thérapeutique. L'adjuvant communément utilisé est l'adjuvant complet de Freund (première administration) et l'adjuvant incomplet de Freund (rappel) mais d'autres adjuvants pourront être utilisés.

Le nombre d'animaux utilisés durant le projet (3 ans) est de :

- 3 à 18 lapins hybrides néozélandais
- 15 à 90 rats OFA-SD.

Les prélèvements sanguins sont effectués sur l'animal vigile pour les lapins et sur l'animal anesthésié pour les rats.

3435. La principale mission du laboratoire est de développer et mettre sur le marché de nouvelles molécules (protéines humaines plasmiques ou recombinantes) à usage thérapeutique pour la prise en charge de pathologies graves et souvent rares, dans les domaines de l'immunologie, des soins intensifs et de l'hémostase/ maladies rares. Dans le cadre du développement d'un nouveau médicament, des études chez l'animal sont requises pour étudier la pharmacocinétique de la molécule. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. Ces études permettent entre autres de :

- Sélectionner entre différentes formulations celles qui maintiennent le médicament plus longtemps dans l'organisme.
- Sélectionner entre différents médicaments candidats celui qui reste le plus longtemps en circulation.
- Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament.
- Sélectionner la meilleure voie d'administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale,..).
- Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.

De plus, ces études sont réglementairement requises et sont indispensables avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique d'immunoglobulines polyvalentes (Ig) après administration unique par voie parentérale chez le lapin. L'Ig est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer la concentration sanguine de la molécule au cours du temps. Cette cinétique concentration versus temps permet de déterminer si l'Ig reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est la concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, si la molécule reste majoritairement en circulation ou si une partie va dans les tissus, etc...

La fréquence et le nombre des prélèvements dépendent de la durée de vie de la molécule chez le lapin. Le protocole expérimental est adapté après revue des données existantes en interne et de la littérature pour des molécules similaires. Généralement, les Ig ont un temps de demi-vie long (supérieur à 24h et pouvant aller jusqu'à 9 jours) et la cinétique totale (jusqu'à l'élimination du produit, qui se situe autour de 5 fois la demi-vie) peut être suivie jusqu'à 45 jours.

Le nombre d'animaux par groupe dépend du nombre de prélèvements nécessaires pour suivre la cinétique. Mais globalement 6 lapins/produit/dose et 3 lapins contrôles seront utilisés. Le volume de sang récupéré par jour respecte les bonnes pratiques de prélèvement sanguin en expérimentation animale (pas plus de 20% du volume sanguin en prélèvements répétés).

Globalement, le nombre maximal d'animaux estimés durant le projet (3 ans) est de 225 lapins hybrides néozélandais.

3436. Le cyclophosphamide (CP) est un toxique immunosuppresseur largement utilisé dans le traitement de cancers ou de certaines maladies auto-immunes. Cependant, il a été rapporté que son utilisation provoque des lésions pulmonaires aigües chez l'Homme et l'animal. Si les atteintes pulmonaires du CP sont bien documentées au niveau du tissu pulmonaire, son action reste méconnue sur le lit vasculaire.

Il a été observé que 15 à 50% des patients traités aux CP à forte dose pouvaient développer une Maladie Veino-Occlusive (MVO) du foie. Nous suspectons les CP d'être également responsable de lésions favorisant une MVO pulmonaire.

Afin de vérifier cette hypothèse nous testerons différents traitements de CP en association avec d'autres molécules protectrices censées limiter les effets néfastes du CP tels qu'elles sont proposées chez l'homme. Nous étudierons alors précisément leurs effets sur le lit vasculaire pulmonaire pour vérifier ou non l'implication du CP dans les MVO pulmonaires.

3437. Les glioblastomes (GBM) demeurent des tumeurs très agressives. Actuellement, la population de patients présentant une survie à 10 ans n'excède toujours pas 13 % en France malgré une thérapie agressive associant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Un aspect essentiel de la limitation des traitements ciblant les glioblastomes repose sur la difficulté d'augmenter les doses (radiothérapie, chimiothérapie) de part de potentiels effets de ces traitements sur le tissu cérébral sain. Une autre approche thérapeutique a récemment vu le jour et est en cours de validation dans le cadre d'essai cliniques de phase III, c'est le recours à des traitements anti-angiogéniques, ciblant particulièrement le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) au moyen d'un anticorps monoclonal le bevacizumab (Roche).

Une caractéristique essentielle des GBM réside dans leur caractère hautement hypoxique. L'hypoxie intratumorale représente un obstacle majeur à l'efficacité des thérapies conventionnelles des glioblastomes que sont la radiothérapie et la chimiothérapie et à ce titre représente un signe de très mauvais pronostic pour les patients. Ceci est d'autant plus patent pour la radiothérapie, qui, pour être efficace sur les cassures d'ADN, nécessite la molécule d'oxygène. De plus, par des effets suspectés sur la perfusion, la fonction endothéliale ou les fonctions mitochondriales, il a été montré que la radiothérapie pourrait elle-même induire des changements d'oxygénation de la tumeur.

A ce titre, pouvoir augmenter temporairement les degrés d'oxygénation intratumorale permettrait de pouvoir augmenter l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie, voire même de pouvoir réduire les doses actuellement prescrites, sans pour autant stimuler la croissance des cellules tumorales elles-mêmes.

Ces études seront réalisées sur 720 rats Nude mâles.

3438. Des données récentes en transplantation d'organe solide ont établies que la perte progressive des greffons vascularisés est liée à la génération d'anticorps dirigés contre les molécules HLA spécifiques du donneur par le système immunitaire du receveur. Le diabète de type I, une maladie auto-immune dont l'incidence explose dans le monde, est responsable d'une très importante morbidité dans les pays développés. La greffe d'îlots de Langerhans (produisant de l'insuline) est une thérapie cellulaire de choix pour les patients diabétiques mais son succès au long cours est limité par une destruction progressive des îlots greffés.

Plusieurs études cliniques rétrospectives ont montré que la présence d'anticorps anti-HLA était associée à un risque supplémentaire d'échec mais il n'y a pas de démonstration formelle du rôle causal des anticorps anti-HLA dans le rejet des greffes d'îlots (ces derniers pourraient être de simple marqueur de la réponse lymphocytaire T).

Cette incertitude constitue actuellement un obstacle majeur pour développer des stratégies immunosuppressives efficaces.

Le présent projet propose d'utiliser un modèle murin pour établir le rôle des alloanticorps dans le rejet des greffes d'îlots. Des souris immunodéficientes, incapables de rejeter les îlots allogéniques qui leur auront été transplantés, seront complétées soit avec des alloanticorps soit avec des lymphocytes alloréactifs provenant de souris immunocompétentes.

Si un effet délétère des transferts passifs d'alloanticorps est démontré, le modèle sera utilisé pour établir les mécanismes moléculaires par lesquels les anticorps entraînent la destruction des îlots (compléments ou recrutement des effecteurs de l'immunité innée) et pour déterminer si on peut protéger les îlots de la destruction en changeant le site de la greffe (i.e. en les rendant moins accessibles aux anticorps circulants).

La réalisation de ces expériences, cruciales pour faire progresser la technique de greffe d'îlots en clinique, nécessite le recours au modèle murin décrit ci-dessus.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum selon la règle des 3R. Un calcul statistique du nombre minimum et suffisant des effectifs pour obtenir des informations scientifiques valides a été réalisé (Mann Whitney). Pour chaque animal, le maximum d'informations sera recueilli.

Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole afin de minimiser son impact. Pour chaque acte chirurgical (greffe de peau, greffe d'îlots pancréatiques), les souris seront anesthésiées par une association kétamine/xylazine et elles recevront du doliprane 2,4 % per os 24 h avant l'acte et pendant 5 jours après l'acte.

Les animaux seront observés 1 fois par jour pendant 5 jours après chaque acte chirurgical puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin du protocole afin de mettre en évidence toute souffrance de l'animal suivant les critères suivants: prostration de la souris à l'ouverture de la cage, apparition d'un pelage hirsute.

A l'apparition de ces signes, les souris seront euthanasiées.

Pour la greffe d'îlots, les animaux seront pesés une fois par semaine. Si une perte de poids de plus de 20 % par rapport au poids de départ ou si une perte de poids de plus de 10 % / semaine est mise en évidence, les souris seront euthanasiées.

Au total, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet est de 258 souris

3439. Ce projet s'inscrit dans un ensemble de travaux visant à comprendre le rôle des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme:  $\alpha$  et  $\beta$ . Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau, mais leurs rôles spécifiques au niveau du cerveau ont été difficiles à évaluer jusqu'à présent en raison de la difficulté à séparer les effets centraux des effets périphériques de l'hormone. Pour contourner ce problème, nous disposons de lignées de souris permettant un ciblage spécifique des récepteurs  $\alpha$  du cerveau. Ce projet porte sur des lignées pour lesquelles une mutation du récepteur  $\alpha$  est exprimée dans les neurones GABA-ergiques. L'objectif de cette étude est d'analyser, dans plusieurs régions du cerveau, les conséquences induites par l'expression de cette mutation dans les neurones GABA-ergiques.

Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension des fonctions des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Elle repose sur des croisements de lignées de souris transgéniques pour lesquels nous n'attendons pas d'effet délétère pour la souris. Les procédures sur l'animal consisteront essentiellement à prélever le cerveau des souris, ce

prélèvement étant parfois précédé d'injections intrapéritonéales d'hormones dans les semaines précédentes. L'intervention destinée à prélever le cerveau des souris est réalisée sous anesthésie profonde et sans réveil, si bien qu'aucune souffrance animale n'est attendue lors de ce geste.

Ce projet concernera 170 souris au maximum. Compte tenu de la complexité du cerveau, des études *in vivo* sont nécessaires pour étudier le rôle de la signalisation thyroïdienne dans cet organe. Notre équipe réalise en parallèle des études *in vitro* qui permettent notamment d'aborder les aspects moléculaires de cette signalisation. Pour les expériences *in vivo*, nous travaillons avec des souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il est possible de cibler l'expression d'une mutation du récepteur à de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Le nombre de souris indiqué est un nombre maximum, qui ne sera probablement pas atteint dans la mesure où nous arrêterons le projet dès qu'un nombre d'observations suffisant aura été réalisé. Les petits issus des nouveaux croisements de lignées seront suivis avec un soin particulier, afin de repérer précocement un éventuel phénotype délétère. Une grande attention sera portée à la vérification de la profondeur d'anesthésie au moment de la réalisation de l'intervention destinée à prélever le cerveau.

3440. La réponse inflammatoire est généralement bénéfique pour l'organisme car elle le protège efficacement contre les infections et permet la réparation des tissus lésés suite à une blessure. Cependant lorsque l'inflammation est chronique ou excessive, elle devient délétère causant des syndromes auto-inflammatoires pouvant causer jusqu'à la mort du patient. L'inflammation est donc très finement contrôlée. Un nombre croissant d'études souligne le rôle de l'inflammation chronique dans la progression de pathologies aussi répandues que le diabète de type 2, la maladie de la goutte, la maladie de Alzheimer, l'athérosclérose ou le cancer. Notre objectif est donc d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'inflammation afin de pouvoir les cibler dans de nouvelles approches thérapeutiques.

#### 2- Retombées attendues

L'identification et la caractérisation des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation déboucheront sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anti-inflammatoires pour lutter contre les pathologies sus-citées.

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

Afin de limiter le recours au modèle animal, nous menons nos expériences *in vitro* en utilisant des macrophages péritonéaux de souris. Nous recueillons de façon *post mortem* environ 30 millions de macrophages par souris, ce qui nous permet de tester de nombreuses conditions expérimentales en utilisant un minimum de souris. Afin de limiter la souffrance et l'anxiété des animaux, nous mettons en œuvre des mesures d'acclimatation de 5 jours après leur arrivée en zone d'hébergement, d'enrichissement des cages notamment avec du coton, et nous limiterons l'hébergement individuel au strict minimum. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour tous signes de maladie et douleur. Les animaux malades seront mis à mort pour éviter toute souffrance prolongée.

#### 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet: 530 souris

3441. *Acinetobacter baumannii* est un pathogène nosocomial émergent.

La capacité d'*A. baumannii* à acquérir rapidement des multiples résistances aux antibiotiques est bien établie, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore compris. Ce projet consiste à en étudier le transfert génétique entre les souches d'*Acinetobacter baumannii*. Ce transfert génétique est un événement clef pour l'acquisition des résistances aux antibiotiques un des problèmes majeurs de santé publique dans le cadre des bactéries pathogènes nosocomiales.

Une expérience pilote permettra d'établir l'inoculum nécessaire, et ensuite l'expérience d'échange génétique sera faite avec un seul inoculum et un seul temps permettant de réduire le nombre de souris à utiliser. Le reste de l'étude se déroulera *in vitro* pour caractériser les mécanismes de transfert.

Nous allons utiliser le maximum de 123 souris pour une durée de 2 ans. Lorsque nous arriverons à la 1<sup>ère</sup> quantité de bactéries estimée nécessaire dans la rate avec le plus bas inoculum nous arrêterons le projet et seulement 27 souris seront utilisées. L'étude se poursuivra *in vitro*, dans le laboratoire, pour caractériser les événements de transfert génétique observés.

3442. L'exposition chronique ou aiguë aux toxines fongales pouvant contaminer l'alimentation (Aflatoxines, fumosines, deoxynivalenol etc.) se révèle dangereuse pour la santé humaine. Pour cette raison, les pays développés ont établi des régies très strictes pour limiter l'exposition des gens à ces contaminants. Néanmoins dans certaines régions du monde, les gens sont encore exposés aux toxines quotidiennement. Par exemple, en Afrique Sub-Saharienne, en Asie ou en Amérique du Sud, l'Aflatoxine B1 (AFB1) est un contaminant très répandu dans les céréales qui sont la base de leur alimentation.

L'exposition à l'AFB1 est un facteur de risque reconnu dans le développement du cancer du foie chez les personnes infectées par le virus de l'hépatite B. Notre objectif est de comprendre si l'AFB1 peut coopérer aussi avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le développement des tumeurs. Dans les faits, même si 95% de la population mondiale est porteuse de l'EBV sans pour autant développer des maladies, dans certaines régions du monde, l'infection par EBV est associée au développement de certaines tumeurs comme le lymphome de Burkitt endémique en

Afrique équatoriale, ou le carcinome du nasopharynx (NPC) en Asie. Nous pensons qu'il est possible que l'exposition à l'AFB1 puisse accroître la réplication du virus et favoriser la transformation cellulaire. De plus, comme l'AFB1 est un immunosuppresseur reconnu, il pourrait aussi agir en permettant la prolifération des cellules infectées par l'EBV.

Ce projet clinique vise donc à évaluer l'effet du traitement AFB1 et de l'infection par l'EBV sur le développement du lymphome B chez la souris humanisée pour le système hématopoïétique.

Afin de mimer le système immunitaire humain tout en évitant d'expérimenter sur des primates, le modèle animal choisi est la souris humanisée avec des cellules hématopoïétiques humaines. Au cours de ce projet, nous évaluerons l'effet du traitement AFB1 seul, de l'infection EBV seule ou de la coopération AFB1/EBV sur la modification du compartiment des cellules B. Le modèle murin pour l'infection EBV a été généré et utilisé pour l'étude des différents aspects de l'infection par EBV et de la transformation induite par celle-ci. D'autre part, plusieurs protocoles ont été établis pour traiter le modèle animal, dont la souris, avec l'AFB1 afin d'étudier ses effets toxiques in vivo.

Ici nous voulons évaluer les effets de l'exposition chronique ou aiguë à l'AFB1 sur la susceptibilité des souris à être infectées par l'EBV et à développer les lymphomes.

Retombées attendues: Nos résultats in vi/ro obtenus sur des cellules B primaires traitées à l'AFB1 ont montré que ce traitement favorise l'infection des cellules par EBV.

Cette étude clinique pourra confirmer ces résultats in vivo en démontrant que l'AFB1 pourrait être un facteur de risque dans le développement de lymphome de Burkitt ou d'autres tumeurs induites par EBV. De plus, en pratique, cette découverte pourrait conduire les gouvernements des pays intéressés à adopter des mesures plus strictes pour réduire l'exposition de la population et des animaux d'élevage à la nourriture contaminée par l'AFB1.

Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences et mises au point in vitro.

Ce projet comporte 30 animaux de la procédure 2 à 4. Ce projet sera répété au maximum 3 fois (soit au maximum 90 animaux).

3443. 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.

3444. L'élevage d'une lignée de lapins diabétiques transgéniques Ins2Akita de statut sanitaire SPF (Specific Pathogen Free) a été récemment initié chez Charles River. Dans le but de caractériser ce modèle de lapins diabétiques de type I, il est nécessaire d'effectuer des mesures régulières de glycémie et un suivi clinique des lapins. Ces mesures permettront également de contrôler le statut hyperglycémique de ces animaux.

La glycémie de huit femelles et six mâles, âgés de 11 semaines en début d'étude, sera mesurée deux fois par semaine durant 20 semaines. Du fait de la caecotrophie des lapins, leur glycémie est susceptible de varier durant la journée, une première mesure sera donc effectuée le jeudi matin à 8 heures, la seconde le jeudi après midi à 15 heures. Une observation des animaux sera effectuée quotidiennement. Un examen clinique complet sera effectué une fois par semaine au moment de la pesée, avec une attention plus particulière pour les yeux (opacité au niveau du cristallin) et les veines marginales de l'oreille (hématome).

Les quatorze animaux participant à l'étude sont les seuls animaux ayant été déclarés transgéniques (Ins2Akita). De manière à ce que l'étude soit la plus représentative possible des glycémies observables chez des lapins diabétiques Ins2Akita, les glycémies de ces quatorze lapins seront mesurées.

3445. Le choc septique est une insuffisance cardiocirculatoire aiguë survenant au cours d'une infection grave (en générale bactérienne : septicémie, péritonite...) et qui peut aboutir à une défaillance multiviscérale et au décès du patient en l'absence de prise en charge. Il s'agit d'un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente avec le vieillissement de la population et dont la mortalité est comprise entre 30 et 50%. Malheureusement il n'existe pas de traitement spécifique adapté à cette pathologie conduisant à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Notre projet vise à identifier, grâce à notre modèle animal, de nouvelles approches pour réduire la mortalité chez ces patients.

La ligature-ponction caecale (LPC) est un modèle développé depuis une vingtaine d'années, principalement chez le rongeur. La contamination bactérienne stercorale provoquée par les ponctions entraîne une péritonite et un choc septique dont la

physiopathologie est proche d'un choc septique sepsis par rupture d'organe creux chez l'humain (péritonite par perforation). La standardisation de la procédure, et notamment du nombre et de la taille des ponctions caecales permet l'obtention d'une mortalité prédictible et proche de la pathologie humaine : les courbes de survie des animaux de 6 à 16 semaines sont corrélées à celle de patients de 10 à 17 ans. La bonne adéquation du modèle à la pathologie humaine et sa simplicité de mise en œuvre sont les atouts majeurs de la LPC qui est reconnue comme modèle de référence.

En effet, la position de la ligature caecale et le nombre de ponctions réalisées sont deux facteurs déterminants de la sévérité du sepsis et de la mortalité dans le modèle LPC. Pour cela, nous prévoyons dans cette étude une première phase de mise au point qui permettra de déterminer les conditions optimales pour induire un choc septique sévère dans, au plus tard, les 24 heures qui suivent la LPC. Ce modèle permettra de se placer dans la phase précoce du choc, qui est malheureusement très peu étudiée dans la littérature. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les différentes procédures expérimentales (cf. ci-après) de cette première étape seront réalisées sur des effectifs réduits afin de tester les différentes conditions pour induire un choc septique sévère (défini notamment par les paramètres hémodynamiques des animaux : pression artérielle, fréquence cardiaque...). Dans un second temps, lorsque les conditions d'utilisation optimales auront été déterminées, les procédures seront réalisées sur un plus grand nombre d'animaux avec seulement les conditions sélectionnées dans la première étape. Dans des conditions clairement définies nous testerons différents (3) traitements permettant d'améliorer la fonction circulatoire et nous l'espérons in fine la mortalité des animaux.

Afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à raffiner nos techniques et à limiter le nombre d'animaux utilisés. Afin de prévenir des souffrances non nécessaires et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude (cf. 3.4.13). Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=8-15 suivant les manipulations), le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer environ 335 animaux, Une petite partie des manipulations (environ 60 à 80 animaux) pourraient être réalisées sur des souris afin de valider nos observations sur un autre modèle animale.

3446. Cette série de travaux pratiques centrés sur l'étude des processus mnésiques chez le rat vise à sensibiliser les étudiants de manière réaliste à l'expérimentation animale dans le domaine des neurosciences. Cet enseignement prend place en dernière année de Licence. Il aide les étudiants à s'orienter pour les choix des thématiques qu'ils aborderont dans le cadre des divers Masters qu'ils peuvent intégrer. Plutôt que de proposer pour chaque séance de TP un thème différent impliquant l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, nous avons développé une étude transversale pluridisciplinaire où les animaux utilisés dans cette série d'expériences sont suivis de séances en séances tout au long du semestre. Pour chaque groupe de TP constitué de 7 étudiants au maximum, 3 rats sont utilisés, ce qui correspond à 12 rats maximum pour une promotion de 28 étudiants (chiffre jamais atteint à ce jour). Le premier TP est dédié à la lésion bilatérale de l'hippocampe dorsal, structure impliquée dans les processus d'apprentissage. L'altération des performances mnésiques des animaux lésés est ultérieurement évaluée dans différentes tâches comportementales. A l'issue de ces observations, l'étendue des lésions est évaluée dans le cadre d'une double approche ; in vivo par IRM, puis post-mortem à l'aide de diverses techniques histologiques. Parallèlement un TP d'électrophysiologie est dévolu à l'étude de la Potentialisation à Long Terme. L'ensemble des résultats obtenus est analysé pour l'année en cours, mais est également mis en perspective avec un corpus de résultats obtenus les années précédentes afin de préparer un travail sur le traitement statistiques des données. Enfin une discussion sur l'éthique et l'expérimentation est engagée dans le cadre de travaux dirigés à l'issue de la phase expérimentale.

3447. La perception tridimensionnelle de l'espace comprend différents aspects basés sur des indices rétinien binoculaires de disparités et monoculaires (ombrage, perspective, recouvrement, texture, contraste de couleurs...) auxquels s'ajoutent des indices contextuels extra-rétiens de types oculomoteurs, auditifs, proprioceptifs ou encore de gravité. Tous ces éléments concourent à la construction multisensorielle du percept 3D. Le contexte 3D de la scène peut en retour moduler le percept de l'objet ou encore influencer sa reconnaissance. Ce sont ces 2 aspects contextuels 3D 'bottom up' (construction) et 'top down' (influence contextuelle) que l'on se propose d'étudier par des approches électrophysiologiques chez le singe vigile (3 animaux seront impliqués).

3448. Ce projet de recherche a un double objectif fondamental : (1) comprendre comment le cerveau estime les propriétés de l'espace tridimensionnel (3D) environnant et (2) comprendre comment ces informations participent à la perception d'objets et de scènes visuelles.

Un premier aspect du projet propose donc d'identifier les aires corticales impliqués dans le traitement de différents indices spatiaux, qu'ils soient visuels (disparités binoculaires, flux optique, etc ...) ou non-visuels (signaux oculomoteurs, vestibulaires, etc ...). Le second aspect vise à mesurer comment la représentation corticale d'objets et de scènes visuelles est modulée par ces indices spatiaux. Dans les 2 cas, nous proposons d'employer l'imagerie fonctionnelle (IRMf) chez le singe macaque pour étudier ces questions.

Cette technique faiblement invasive offre l'avantage de pouvoir comparer 1 directement les résultats obtenus chez le singe à ceux obtenus chez l'homme avec des protocoles expérimentaux comparables. Il est ainsi possible d'identifier les homologies fonctionnelles mais aussi les spécificités des réseaux corticaux mis en évidence chez ces 2 espèces de primate. Par ailleurs, les

données obtenues chez l'animal permettent de localiser précisément les aires corticales d'intérêt, ouvrant ainsi la voie à des approches focalisées en électro-encéphalographie (EcoG) et par enregistrements de neurones isolés.

Ce projet est d'ailleurs lié à 2 autres projets (soumis par les mêmes responsables 1 scientifiques) proposant de combiner l'approche par IRMf aux approches par EcoG et par enregistrement neuronal. L'objectif est de s'appuyer sur la complémentarité de ces différentes approches afin d'aborder les mécanismes étudiés à différents niveaux d'intégration: des réseaux corticaux jusqu'aux neurones isolés.

La présente demande fait suite à 2 précédentes saisines sur le même thème

3449. Les lésions de la moelle épinière sont pour la plupart d'origine traumatique et conduisent à des altérations majeures des fonctions sensorimotrices. Les récupérations fonctionnelles consécutives à ces atteintes sont extrêmement limitées, notamment en raison des capacités adaptatives réduites des tissus endommagés. En outre, ces réhabilitations dépendent notamment de plusieurs événements cellulaires tels que l'activation astrogliale qui conduit à la formation de la cicatrice gliale, ou encore l'inflammation dont les cellules microgliales sont les effecteurs les plus précoces. Durant la première semaine qui suit la lésion, cette inflammation est connue pour exacerber les dommages tissulaires et restreindre les possibilités de récupération. Cependant, des études récentes chez l'animal et chez l'Homme montrent que l'inflammation pourrait avoir à la fois des effets bénéfiques et délétères vis-à-vis des processus de récupération.

Le but de ce projet est de caractériser chez le rat adulte ayant subi une atteinte médullaire cervicale partielle, l'influence d'une modulation de l'inflammation. La lésion correspond à une hémisection médio-latérale cervicale entre les myélomères C4 et C5. Dans une première partie de ce travail nous caractériserons l'implication de la microglie dans la cinétique d'élimination des débris cellulaires, autour et à distance de la lésion.

Nous étudierons également la contribution des cellules microgliales à la formation de cavités dans les régions proches de la lésion. Parallèlement, l'effet d'un traitement aigu par une cytokine pro-inflammatoire, le Granulocyte/Macrophage - Colony Stimulating Factor (GM-CSF) sera évalué sur le plan histologique et fonctionnel. Le GM-CSF est notamment connu pour favoriser l'activation microgliale et pour réduire la gliose après atteinte centrale. Cette étude consiste à évaluer les altérations structurales autour et à distance de la lésion, ainsi que les déficits et les récupérations comportementaux et électrophysiologiques en lien avec la motricité, la posture ainsi que la sensibilité tactile et douloureuse. Ces problématiques seront abordées au cours des cinq prochaines années, elles nécessiteront un total de 370 rats.

3450. Le carcinome hépatocellulaire (HCC), est la tumeur maligne du foie la plus fréquente. Ce type de néoplasie est actuellement considéré comme le cinquième cancer le plus répandu mondialement et l'absence de traitement efficace en fait la troisième cause de décès liés au cancer. Le HCC se développe très rarement sur un foie sain. Il est généralement la conséquence d'agressions diverses aboutissant à l'endommagement du foie (par exemple la cirrhose). Parmi ces agressions, on trouve l'infection virale par le virus de l'hépatite C (VHC). L'inflammation chronique associée à l'infection par le VHC engendre de multiples effets délétères, y compris l'initiation et la progression du cancer du foie.

Le développement d'animaux transgéniques exprimant tout ou partie des protéines virales du VHC ont permis de mieux comprendre la relation entre le VHC, l'inflammation et l'apparition de tumeurs. C'est le cas des souris transgéniques FUN-35 (fond C57BU6) pour lesquels le cadre ouvert de lecture du VHC est exprimé spécifiquement dans le foie. Les mâles FUN-35 sont à risque pour le développement d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires. Nous souhaitons maintenant étudier plus en détails cette réponse inflammatoire, pour cela nous sommes dans l'obligation de travailler sur modèle animal qui est le seul modèle adapté pour mettre en évidence toute la complexité de la réponse inflammatoire. Cependant nous sommes limités par l'utilisation des souris transgéniques FUN-35 qui ne permettent pas d'effectuer une analyse fine de la réponse inflammatoire induite par le VHC. Ceci est notamment lié au fait que ces souris expriment la totalité des protéines virales de façon constitutive et ne sont donc pas reconnues comme "exogènes" par le système immunitaire. Nous souhaitons pour pallier à ce problème utiliser un système de reconstitution du foie basé sur le modèle de souris fah-/- qui permet la réimplantation d'hépatocytes modifiés préalablement *in vitro* et ainsi d'étudier le rôle de différents gènes (y compris viraux) sur l'inflammation hépatique liée au VHC. Cette étude *in vivo* sera associée à une étude *in vitro* qui permettra de décortiquer plus en détail les voies de signalisation impliquées et de réduire le nombre d'animaux utilisés (estimé à 110).

Ce projet nous permettra ainsi de mieux comprendre le rôle de différents gènes sur l'inflammation initiée par le VHC.

3451. La dermatite allergique de contact est une maladie fréquente causée par contact de la peau avec des agents chimiques (tels que les colorants, polluants, conservateurs, métaux) présents dans notre environnement. C'est un problème de santé publique car c'est la première cause de maladie professionnelle. L'équipe travaille depuis de nombreuses années sur la physiopathologie et le traitement de la dermatite de contact.

Nous avons notamment montré, dans le modèle d'hypersensibilité retardée de contact aux haptènes chez la souris, (qui reproduit la dermatite de contact chez l'homme), que l'exposition orale à l'haptène allergisant est capable de prévenir la sensibilisation et le déclenchement de la maladie allergique. Plus récemment, l'analyse des mécanismes en cause dans la prévention de la maladie a révélé le rôle essentiel de cellules dendritiques intestinales tolérogènes et nous a permis d'identifier le rôle clé d'un récepteur de la microflore dans l'effet tolérogène de ces cellules dendritiques.

L'application de ces données à des fins thérapeutiques ou vaccinales chez l'homme, nécessite de définir si le récepteur identifié doit être exprimé par la cellule dendritique tolérogène ou par des macrophages intestinaux, également susceptibles à la microflore.

Le but de ce projet est donc d'évaluer l'importance relative de l'expression du récepteur toléro-gène dans les cellules dendritiques et/ou dans les macrophages de l'intestin, pour dans la prévention de la maladie.

Pour ce faire, il est indispensable de générer des souris chimères chez lesquelles le récepteur d'intérêt est sélectivement absent de l'une ou l'autre des deux sous population de cellules myéloïdes d'intérêt (cellules dendritiques versus macrophages). Ces souris pourront alors être utilisées dans notre protocole de tolérisation orale pour évaluer l'importance relative de l'expression du récepteur sur chaque type cellulaire d'intérêt. L'équipe est spécialisée dans ces modèles in vivo et dans la genèse de souris chimères. Les protocoles en question (voisin de la greffe de moelle chez l'homme) sont tout à fait bien tolérés, sans effet secondaires ni douleur, ni mortalité. Par ailleurs, la combinaison génétique des cellules greffées est telle que la souris chimère ne souffrira pas d'un désordre physiologique vital.

2- Les retombées attendues du projet sont de déboucher sur de nouvelles biothérapies mieux ciblées de pathologies allergiques et inflammatoires. L'approche méthodologique proposée permettra de lever des verrous d'une importance capitale pour progresser dans les traitements physio-pathologiques de l'eczéma, à l'heure où des approches thérapeutiques basées sur les effets de la nutrition et de la flore digestive sont en train d'être explorées en recherche comme dans l'industrie.

3- Ces études ne peuvent se faire in vitro, car le but est de suivre des événements dans un contexte physiologique à l'échelle de l'animal entier, dès l'exposition orale à l'allergène, par les différents types de cellules myéloïdes de la muqueuse. Il nous faut par ailleurs utiliser ce modèle d'allergie chez la souris, car il a déjà été validé à l'échelon international pour sa pertinence par rapport à l'eczéma de contact chez l'homme.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans entraver l'interprétation des résultats et leur significativité au plan statistique. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

4- La procédure expérimentale décrite ci-dessous ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux; le nombre total de souris a été fixé à 72 animaux soit 36 par procédure, renouvelée une fois.

3452. Les anémies hémolytiques à médiation immune correspondent à la destruction des globules rouges par le système immunitaire de l'individu. Elles sont fréquentes chez le chien et mettent en danger sa vie. L'une des complications les plus graves est l'apparition d'un caillot sanguin dans un vaisseau, secondaire à un état d'hypercoagulabilité (le sang de l'animal coagule trop et trop vite). En fonction de la taille et de la localisation de formation du caillot, des symptômes graves peuvent apparaître rapidement et peuvent mener à la mort de l'animal. Nous avons à ce jour peu de moyens de diagnostic précoce et de traitement de ces caillots sanguins, et le vétérinaire est parfois impuissant pour soigner ces animaux.

Afin de limiter l'apparition de ces caillots, il faudrait pouvoir détecter précocement l'état d'hypercoagulabilité apparaissant chez l'animal ayant une anémie hémolytique à médiation immune et mettre en place rapidement un traitement anticoagulant. Or, aujourd'hui, les paramètres d'évaluation de la coagulation disponibles et utilisés chez le chien sont modifiées tardivement, lorsque le risque d'apparition de caillot sanguin est déjà très grand. De plus, les effets des traitements anticoagulants ont été étudiés uniquement chez des chiens sains et de race Greyhound, chiens ayant des paramètres de la coagulation sensiblement différents des autres races de chiens rencontrées en pratique de tous les jours.

Chez l'homme, il existe des marqueurs plus précoces et plus sensibles dans la détection d'un état d'hypercoagulabilité et l'évaluation des effets des anticoagulants sur l'hémostase, mais il n'existe pas de valeurs usuelles chez le chien.

Ainsi, dans cette étude, nous allons développer le dosage de ces paramètres sur des chiens sains. Pour ce faire, des prises de sang seront réalisées sur 8 chiens sains de race Beagle avant et après injection d'un anticoagulant. La dose utilisée sera fixée en fonction d'une étude in-vitro préalable à l'étude chez le chien sain. Dans cette étude in vitro, des doses inférieures, égales et supérieures à la dose publiée chez le Greyhound seront rajoutées à du sang de chiens sains. Nous réaliserons ensuite les différents tests sanguins sur chaque échantillon afin de tester leur sensibilité à la présence de l'anticoagulant. Les chiens seront leur propre témoin. Associé à l'étude in-vitro, cela va permettre de limiter le nombre d'animaux utilisés tout en assurant une analyse statistique fiable. Les éventuels effets secondaires seront recherchés par un vétérinaire plusieurs fois par jour, et l'animal sera sorti de l'étude en cas de détection d'un point limite fixé dans l'étude.

Cette phase d'étude chez le chien sain est primordiale pour avoir des valeurs de référence des tests étudiés, pour ensuite pouvoir les utiliser chez des chiens atteints d'anémie hémolytique à médiation immune, et évaluer l'efficacité du traitement anticoagulant.

3453. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, et la maladie coronaire est responsable, à elle seule, de 49% de ces décès. Cette pathologie se caractérise par le développement de lésions dans la paroi des artères coronaires qui irriguent le cœur. En pratique clinique, 2/3 des accidents coronaires aigus sont causés par la rupture de plaques d'athérome vulnérables. Ces plaques vulnérables, qui sont le siège d'importants phénomènes inflammatoires, ne sont que peu voire pas sténosantes. De ce fait, on ne dispose à ce jour d'aucune méthodologie permettant d'en faire le diagnostic de manière non invasive. Le cholestérol, sous sa forme oxydée, est le principal facteur responsable de l'état inflammatoire de ces lésions. Le laboratoire porteur du présent projet a récemment mis au point une molécule radiomarquée, ou radiotracer, Ce radiotracer se fixe spécifiquement à VCAM-1, une molécule impliquée dans les phénomènes inflammatoires. Suite à son administration par voie intraveineuse, des caméras dédiées (gamma-caméras) permettent de visualiser et de quantifier la distribution de ce radiotracer dans l'organisme. Sur un modèle murin d'athérosclérose, ce radiotracer permet de visualiser, de manière non-invasive, le développement de plaques d'athérome aortiques. Ce radiotracer est à présent parfaitement validé sur ce modèle animal. L'objectif de la présente étude est d'utiliser ce nouvel agent d'imagerie afin de tester, chez la souris, des thérapeutiques destinées à inhiber la formation des plaques

d'athérome vulnérables. Dans ce but, deux thérapeutiques déjà disponibles en pratique clinique seront utilisées pour établir des données de référence (Statines et Ezetimibe). Ceci permettra, dans le futur, de tester de nouvelles thérapeutiques dans les mêmes conditions et les comparer à ces molécules de référence. Ces études seront conduites sur 2 modèles murins d'athérosclérose : d'une part la souris déficiente en apolipoprotéine E (ApoE-/-), modèle de référence pour l'étude de l'athérosclérose, et d'autre part la souris ApoB100/CETP, qui offre l'avantage d'avoir un profil de lipoprotéines plasmatiques (LDL, HDL) comparable à l'homme, et qui de ce fait est particulièrement bien adaptée pour tester des thérapeutiques ciblant le transport du cholestérol. L'un des avantages de la méthodologie proposée ici est le fait que le suivi longitudinal par imagerie non invasive du développement des lésions permettra de diminuer le nombre d'animaux nécessaire à l'évaluation de nouvelles thérapeutiques. Au total, 84 souris seront incluses dans ce protocole, sur une durée de 2 ans. Plus précisément, 36 souris ApoE-/- et 48 souris ApoB100/CETP seront utilisées pour obtenir des données avec les molécules de référence. Ces animaux seront hébergés en cages avec enrichissement du milieu de vie. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié à l'injection intraveineuse du radiotracer.

3454. Ce projet a pour but l'étude des différents mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place du système cardiovasculaire chez la souris. Nous étudierons les étapes précoces du développement cardiaque (E7-E14) pendant lesquelles les cellules progénitrices cardiaques prolifèrent, s'ajoutent au cœur primitif et se différencient en cardiomyocytes. Nous nous intéresserons également aux étapes fœtales du développement du cœur (E14-E18). Aux cours de ces étapes tardives, nous étudierons la prolifération des cardiomyocytes ainsi que la mise en place du système de conduction et des réseaux vasculaires coronaires et le maintien des cellules progénitrices à l'état indifférencié. Nous nous intéresserons également à comprendre le lien entre l'origine des cellules cardiaques et celles des muscles du cou et de la face. Enfin nous analyserons la réactivation de mécanismes développementaux lors de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte.

Le présent projet va permettre de mieux comprendre le développement du cœur, l'étiologie des pathologies congénitales et proposera de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en vue de thérapies régénératrices chez l'adulte.

Les objectifs proposés sont parfaitement réalisables sur 5 ans aux vues des différentes ressources financières (ANR, FRM (Equipe FRM), ITN Marie-Curie, AFM, EU\_FP7) et humaines disponibles (12 personnes). Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animales : 4 chercheurs (4 formations B et 2 chirurgie), tous les étudiants en thèse suivent la formation B et le personnel technique suit la formation A. Par ailleurs nous utilisons du matériel de dernière génération et notre établissement possède un agrément propice à l'expérimentation animale.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 110 souris sauvages et 1115 souris génétiquement modifiées.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, l'étude de cellules cardiaques en culture ne permet pas d'analyser les interactions cellules-cellules telles qu'elles sont situées dans le cœur entier. De plus, en culture, les cellules ne sont pas sujettes au débit et à la pression du sang non plus qu'aux nombreux autres facteurs et signaux qui sont le propre d'un organisme entier et vivant. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles de cardiopathies congénitales qui permettent d'étudier l'origine embryonnaire de ces anomalies.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés.

Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises. Ainsi l'ensemble de ces arguments démontre la faisabilité de notre projet.

3455. Ce projet consiste à proposer des TP de comportement aux candidats à la formation de niveau 1 en expérimentation animale. Ces TP ont pour but de présenter différents tests comportementaux d'évaluation de la locomotion, de la douleur, de l'anxiété et de la mémoire chez la souris. Le principe de chaque test sera montré sur des souris sauvages Swiss (20 souris en tout pour le TP chaque année) et des supports vidéo seront utilisés pour présenter des exemples de modèles pathologiques (dans le but de réduire le nombre d'animaux par TP). Ce TP a lieu chaque année en 2 séances de 20 étudiants chacune.

3456. La shigellose, ou dysenterie bacillaire, est une maladie infectieuse d'origine bactérienne qui se caractérise notamment par une gastro-entérite aigue. Chaque année, la shigellose se traduit par plus de 600000 décès dans le monde, essentiellement des enfants de moins de 5 ans. Au sein du genre *Shigella*, quatre espèces (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) ont été identifiées. Il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin commercialisé mais de nombreuses approches sont en cours d'étude.

L'objectif de ce projet est de disposer d'un test in vivo permettant d'évaluer la capacité protectrice d'anticorps induits par différents antigènes issus de *Shigella* et susceptibles d'être à la base de l'élaboration d'un candidat vaccin. Post l'instillation de *Shigella* au niveau de la muqueuse nasale de souris de laboratoire, se déploie un processus de colonisation et d'établissement de ces bactéries et de leur descendance au niveau de différents segments de l'arbre respiratoire supérieur et du parenchyme pulmonaire. Le complexe tissulaire « épithélium- chorion sous épithélial respiratoires » partage des propriétés avec « le

complexe tissulaire « épithélium - chorion sous épithélial intestinaux », ce qui permet de cribler les propriétés protectrices d'anticorps ciblant des molécules de Shigella au niveau de l'arbre respiratoire de souris.

Le protocole d'immunisation passive – instillation d'anticorps au niveau de la muqueuse nasale de souris de laboratoire profondément anesthésiées sera mis en œuvre 60 minutes avant l'instillation d'un inoculum de Shigella. Vingt quatre heures plus tard avant que ne soit initié, au niveau du parenchyme pulmonaire, le processus inflammatoire les souris seront mises à mort. Le nombre de souris auquel nous aurons recours durant les 5 ans ne dépassera pas 300 souris par an, qui seront utilisées dans une procédure de sévérité modérée.

3457. Depuis 30 ans, notre entreprise s'intéresse aux applications des anticorps monoclonaux dans le domaine du diagnostic et de la recherche (Cytométrie, Immunodosage). Les anticorps sont utilisés comme outils de détection spécifiques et très sensibles dans de nombreuses techniques que nous développons et produisons, comme des kits de détection d'hormones (Immunodosages) ou détection d'antigènes tumoraux en cytométrie.

Les animaux sont utilisés dans ce contexte pour :

- Produire les anticorps monoclonaux :

Les anticorps monoclonaux sont produits par des lignées cellulaires immortalisées appelées hybridomes dont l'origine provient de la souris ou du rat. Nous conservons environ 250 hybridomes produisant 250 anticorps différents qui vont être traités ou modifiés pour générer plus de 1000 références utilisées ensuite en diagnostic ou en recherche.

Chaque stock d'anticorps est renouvelé en fonction des besoins définis par la vente de chaque produit correspondant. La méthode de production la plus efficace est la méthode "in vivo" qui consiste à injecter dans la souris, l'hybridome qui sécrète l'anticorps à produire et de prélever ensuite l'anticorps sécrété dans le liquide d'ascite qui s'accumule dans le péritoine de la souris. L'anticorps est ensuite purifié et traité par des techniques de biochimie selon l'application dans laquelle il est destiné.

De la qualité de nos produits et de la reproductibilité de leurs performances dépendent les résultats de diagnostic et de recherche de nos clients. Afin de répondre aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, les cages sont additionnées de rondelles de peuplier pour enrichir l'environnement des animaux, le protocole décrit dans ce document applique les recommandations du Ministère de la Recherche quant à l'utilisation d'analgésique et au nombre de prélèvements et vise à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé en minimisant leur souffrance.

D'autre part, afin de remplacer cette méthode de production in vivo par une méthode de production in vitro, un procédé de production in vitro a été mis en place et notre production in vivo est en cours de conversion (cf. paragraphe spécifique). Cette conversion va cependant s'étaler sur plusieurs années car notre production d'anticorps s'inscrivant dans le cadre réglementaire de produits pour le diagnostic et de normes de qualité ISO9001/ISO13485 et IAS1348, toute modification dans le processus de fabrication requière des étapes de validation démontrant que ces changements n'ont pas d'effet sur les produits commercialisés. A l'heure actuelle, nous utilisons environ 7000 souris par an, ce nombre est appelé à décroître suite à la conversion progressive en production in vitro.

- Contrôler les Anticorps monoclonaux produits

Pour les applications en cytométrie, nos anticorps commerciaux sont vérifiés sur les cellules ou les tissus humains sur lesquels sont exprimés les antigènes cibles de ces anticorps. Pour quelques-unes de nos références, anticorps spécifiques d'antigènes de rat ou de souris, nous effectuons des prélèvements sanguins sur vaisseaux périphériques. C'est pourquoi nous avons besoin d'utiliser environ 6 animaux / an (2 à 3 rats et 2 à 3 souris) sont dédiés à ce projet.

3458. Les tumeurs cérébrales primitives malignes et en particulier les glioblastomes sont les cancers cérébraux les plus fréquents et les plus graves chez l'adulte. Le pronostic des patients souffrant de glioblastome est réservé et ceci malgré des traitements lourds (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie cytotoxique). De nouveaux traitements sont donc nécessaires.

Compte tenu des nombreux traitements innovants actuellement en développement dans les laboratoires académiques et industriels, ces traitements ne pourront pas tous être évalués rapidement dans le cadre d'essais cliniques chez l'Homme.

Il apparaît donc important d'accélérer l'évaluation et la hiérarchisation de ces traitements innovants pour faire bénéficier (dans le cadre d'essais cliniques) les patients souffrant de tumeur cérébrale malignes, au plus vite, des plus efficaces.

Les modèles animaux murins greffés avec des cellules tumorales cérébrales sont des modèles appropriés complétant de manière pertinente les modèles cellulaires in vitro pour sélectionner les traitements innovants les plus prometteurs. En effet, les modèles murins permettent d'étudier l'efficacité des traitements innovants sur des cellules tumorales cérébrales placées dans un micro/macroenvironnement (sous-cutané ou cerveau) récapitulant au plus près celui observé chez l'Homme. Cet environnement joue un rôle clé dans le développement des cellules tumorales et n'est pas parfaitement modélisable in vitro.

Au cours de ce projet nous bénéficierons des résultats obtenus à l'aide de 745 souris et 140 rats. Les efforts fournis afin de réduire, raffiner et remplacer sont : (i) seul les composés ayant apportés les résultats les plus pertinents in vitro par comparaison aux traitements standards, seront testés in vivo, (ii) les cellules tumorales cérébrales greffées chez l'animal sont transduites par le gène de la luciférase permettant de suivre leur développement tumoral en temps réel à l'aide d'un détecteur de bioluminescence sans sacrifier les animaux de manière séquentielle et réduisant ainsi le nombre d'animaux par expérience, (iii) des expériences in vitro sont réalisées afin d'évaluer la capacité des composés à passer dans le cerveau

3459. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme, à l'origine d'un peu plus de 11000 décès par an en France. C'est une maladie complexe, il existe de nombreux sous types de tumeurs mammaires qui ont des profils histologiques, génétiques, génomiques variés expliquant une évolution clinique différente. Cette hétérogénéité constitue à l'heure actuelle un des freins majeurs à une prise en charge thérapeutique optimale des patientes. Le

développement de modèles précliniques mimant la complexité de la maladie est donc indispensable pour définir au mieux le traitement de demain.

La plupart des modèles précliniques existants sont basés sur l'utilisation de lignées cellulaires tumorales qui présentent souvent des altérations génomiques induites par l'adaptation à la culture in vitro, ce qui limite la capacité de ces modèles à prédire l'efficacité de traitement anti-cancéreux. D'autres modèles sont basés sur l'utilisation de souris transgéniques, caractérisés par la modification d'un ou de quelques gènes, ne rendant pas compte de la diversité moléculaire de la maladie.

A l'heure de la médecine personnalisée qui va proposer un traitement plus ciblé sur la diversité moléculaire/cellulaire de la patiente, la xénogreffe de tumeur primaire humaine constitue le modèle préclinique à même de « mimer » la maladie observée chez la patiente et de prédire la réponse thérapeutique d'une tumeur donnée à un traitement précis. Les xénogreffes vont permettre de développer des essais cliniques de nouvelles générations. Ces essais, dits « co-cliniques », permettront de tester en simultané différentes options thérapeutiques pour une tumeur xénogreffée et ainsi orienter le traitement de la patiente.

Lors de la phase opératoire de greffe, outre l'anesthésie durant la chirurgie, en matière de raffinement nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur et souffrance.

De plus, pour le bien-être des souris, nous disposerons en tant qu'enrichissement, des copeaux de bois compactés et du coton pour la nidification dans les cages durant toute la durée de l'hébergement.

En complément de la surveillance quotidienne des animaux, suite à l'apparition des tumeurs, le volume tumoral sera estimé par des mesures hebdomadaires des greffons de manière à évaluer au mieux leur cinétique de croissance et ainsi être en mesure de procéder à l'arrêt du protocole expérimental dans les meilleures dispositions éthiques.

L'analyse histologique du greffon avant réimplantation contribuera à réduire le nombre d'échantillons maintenus dans la banque –et par conséquent, le nombre de souris greffées - uniquement à ceux présentant des caractéristiques comparables à la tumeur prélevée chez la patiente.

Le nombre minimum – mais nécessaire - d'animaux a été calculé afin d'obtenir une banque de 60 modèles nécessaires pour couvrir la diversité moléculaire du cancer du sein et fournir des résultats statistiquement significatifs pour la prédiction de réponse thérapeutique des différentes tumeurs mammaires ainsi établies. Pour la totalité du projet d'établissement de banque de xénogreffe, le nombre d'animaux est estimé à 1520 individus.

3460. Les patients atteints de drépanocytose présentent très fréquemment des ulcères au niveau des jambes. Cette complication chronique est majeure puisque entre 2.5-40% des patients sont affectés par des ulcères qui apparaissent soit spontanément soit de façon secondaire à un traumatisme. Cette complication apparaît généralement chez les jeunes adultes. Elle est malheureusement chronique (durée moyenne : 29.5 mois) et résiste aux différents traitements existant, réapparaissant rapidement après greffe de peau. De plus, les ulcères chez les patients atteints de drépanocytose contribuent largement à la morbidité associée à la maladie puisque des infections locales apparaissent dans 85 % des cas et des analgésiques opioïdes sont nécessaires dans 20% des cas.

La pathogenèse à l'origine du maintien dans le temps de ces ulcères reste mal connue. Notre projet consiste à utiliser des modèles murins de la drépanocytose pour

(1) comprendre les causes de cette complication et de son maintien dans le temps

(2) tester des moyens thérapeutiques permettant d'améliorer cette complication.

Ce projet impliquera un total de 336 souris transgéniques et leurs contrôles sur une période de 3 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicoles (coton, maison, etc.).

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo.

3461. L'objectif de ce projet est de 1) évaluer les tests comportementaux présents dans la plateforme comportement rongeur, 2) valider les aspects méthodologiques, et 3) former les utilisateurs aux tests comportementaux mis à disposition. Afin de réaliser cet objectif, plusieurs lots de souris seront utilisés et soumis aux procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Lors des analyses, différentes variables seront considérées comme le sexe, la souche et l'âge des animaux. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 570 souris et 570 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress

et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes-le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

3462. Tout comme en médecine humaine, la tendance en médecine vétérinaire est à la chirurgie mini-invasive et aux actes vidéo-assistés. Cela permet une récupération plus rapide, moins de douleurs et offre des possibilités étendues tant en terme de diagnostic que de traitement.

L'endoscopie ou fibroscopie vétérinaire est une technique d'"imagerie" qui permet d'explorer l'intérieur de certains organes « creux » ou cavités d'un animal de compagnie à l'aide d'une fibre optique. Ainsi, les vétérinaires peuvent explorer les voies respiratoires (cavités nasales, larynx, trachée, bronches...), le tube digestif (pharynx, œsophage, estomac, intestins, colon...), diverses articulations (coudes, épaules, hanches, genoux, tarse...), etc...

L'endoscopie digestive connaît de très larges indications : au terme d'une séquence raisonnée d'examen complémentaires (analyses sanguines, échographie, radiographies), elle permet le diagnostic de la plupart des maladies œsophagiennes, gastriques, intestinales ou coliques. L'autre volet de cet examen est thérapeutique : extraction de corps étrangers sans avoir recours à la chirurgie, retrait de polypes rectaux, pose de sondes d'alimentation, dilatation de sténoses, gastropexie prophylactique. Cet acte simple et rapide a transformé l'approche des maladies digestives au cours des dix dernières années : réalisé sous anesthésie, et dénué de complications peu fréquentes, il ne nécessite qu'une hospitalisation de quelques heures.

C'est dans ce contexte que nous collaborons avec un organisme de formation indépendant et agréé pour l'attribution des Crédits de Formation Continue (CFC). L'objectif principal de cet organisme est de proposer aux vétérinaires des formations leur garantissant l'acquisition, dans un temps le plus court possible, de nouveaux "savoir-faire".

Dans le cadre de cette collaboration, nous proposons des ateliers de formation à l'endoscopie digestive et respiratoire sur un modèle de porc adulte de taille réduite. Cette formation s'adresse :

- en priorité aux vétérinaires déjà équipés qui souhaitent améliorer ou valider leurs techniques de fibroscopie et de prélèvements ainsi que revoir les matériels, indications, apports et limites de la technique
- aux vétérinaires non encore équipés qui souhaitent appréhender les matériels, indications, apports et limites de la fibroscopie en pratique omnipraticienne et acquérir les gestes de base.

Ces ateliers de formation permettront aux vétérinaires de se familiariser avec le matériel et d'accroître ainsi leur courbe d'apprentissage avant d'intervenir sur les animaux de compagnie.

Ces ateliers de formation sur l'animal auront lieu en moyenne une journée par trimestre, à raison de 2 animaux par journée de formation, soit un total de 8 animaux par an (24 animaux sur les 3 ans du projet).

Règle des 3R :

Remplacement : Le choix d'un modèle in vivo est requis pour ce projet car les méthodes alternatives existantes (formations théoriques seules) ne permettent pas de répondre aux besoins des vétérinaires d'accroître leur courbe d'apprentissage en fibroscopie.

Réduction : Nous avons réduit le nombre d'animaux à 2 par journée de formation, ce qui permet à tous les participants de réaliser et de répéter si nécessaire les gestes de fibroscopie.

Raffinement : Pour les ateliers de formation, les animaux seront placés sous anesthésie générale pour le bien-être de l'animal et pour le confort des opérateurs. La fibroscopie étant un geste non invasif, les animaux seront réveillés et pourront être utilisés pour un autre projet de recherche.

3463. Les coils ou microspires sont utilisés comme dispositifs d'occlusion endovasculaire pour l'embolisation des anévrysmes intracrâniens en neuroradiologie, et en périphérique pour l'embolisation de larges sections vasculaires dans le cas d'hémorragie, anévrysmes, malformation artério-veineuse ou tumeur hypervasculaire.

En 2006, les coils ont été utilisés dans environ 42.500 procédures vasculaires périphériques aux E.U. (Millennium Research Group. US Market for Peripheral Vascular Devices. 2007. MIL 1656538).

Différents types de coils existent selon leur composition (acier, Platine, Tungstène), type de revêtement (sans, fibres de Dacron, Hydrogel), type de relargage du cathéter (détachement contrôlé, poussable), les diamètres et longueurs du dispositif. Ces différents dispositifs correspondent à différentes situations cliniques.

D'autres produits sont en développement tels que les coils 100% polymère, qui permettent d'éliminer les problèmes d'artéfacts sur les clichés radiologiques et de considérablement réduire le coût du dispositif par rapport aux coils Platine. Les revêtements qui couvrent la surface des coils peuvent également être rendus "chargeables" pour l'imprégnation et la libération localement de principes actifs (anti-angiogéniques, anti-inflammatoires, anticancéreux...).

Le projet soumis vise à la formation des radiologues à l'utilisation des coils pour l'embolisation périphérique, afin de :

- Connaître les différents types de coils disponibles
- Connaître les indications anatomiques/cliniques de chaque type de coil
- Être capable d'utiliser dans différentes configurations vasculaires (diamètre, flux, compliance, territoire irrigué) les différents types de coils.

La formation se déroule sur 1 journée. Elle est assurée par un radiologue interventionnel expérimenté dans l'utilisation des coils pour 4 à 6 cliniciens français ou étrangers par session. Elle comporte une partie théorique présentant les différents types de dispositifs disponibles et leurs applications respectives (1h), suivie par une partie pratique où les radiologues sont formés à l'utilisation des produits dans différentes situations vasculaires sur le modèle animal (3h-4h), et enfin une discussion autour de cas cliniques (1h30).

Deux espèces pourront être utilisées: moutons et porcs. Les 2 espèces présentent des similitudes satisfaisantes avec l'homme en termes d'anatomie et physiologie vasculaires.

La procédure est unique et réalisée sous anesthésie générale. Elle consiste à accéder puis à occlure avec des coils les vaisseaux de différents territoires anatomiques (reins, foie, poumons, ...). L'animal n'est pas réveillé à la fin de la procédure.

Principe des 3R :

- Remplacement : Le comportement et le geste de libération/empaquetage des coils sont liés au vaisseau et au flux sanguin et notamment au calibre, à la tortuosité, compliance, flux vasculaire. La formation à leur utilisation ne peut se faire sur banc in vitro et nécessite un modèle animal vivant.

- Réduction : Le nombre total d'animaux utilisé est estimé à 10 par année, sur la base d'un animal par session de formation et 10 sessions de formation par an. Le nombre de participants à la formation est classiquement de 5 médecins, permettant de former environ 50 médecins par an.

Les animaux utilisés seront de préférence des animaux anciennement utilisés pour l'élevage et la reproduction et passés en réforme.

- Raffinement : La procédure unique est réalisée sous anesthésie générale, sans réveil de l'animal.

3464. Avec 60 000 nouveaux cas en France tous les ans, le cancer de la prostate représente aujourd'hui la première cause de mortalité chez l'homme après 70 ans. On compte actuellement 9 000 décès par an pour ce cancer qui touche 1 homme sur 8. Actuellement, le Docetaxel est le traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques résistants au traitement hormonal (CRPC). Cette chimiothérapie apporte un réel bénéfice au niveau de la survie des malades. Malheureusement, on sait qu'une grande partie des malades traités par ce médicament développent une résistance à la chimiothérapie. C'est pourquoi aujourd'hui, l'enjeu majeur consiste à trouver à la fois des méthodes pour prédire cette résistance et de nouvelles combinaisons de traitements pour surmonter cette résistance et éviter les traitements inutiles et toxiques.

Dans notre équipe, nous recherchons les caractéristiques moléculaires associées au développement d'une résistance au médicament, à partir des lignées cellulaires résistantes. Une fois les cibles identifiées, nous recherchons des inhibiteurs et vérifions que ces molécules peuvent être efficaces pour contourner la résistance et tuer les cellules résistantes à la chimiothérapie. Il nous faut ensuite valider ces résultats dans le contexte de la tumeur, sur des animaux porteurs de modèles de cancer de la prostate résistants à la chimiothérapie, avant de les essayer chez l'homme. Bien qu'il existe quelques modèles de cancer de la prostate humain chez la souris, il n'existe pas encore de modèles résistants à la chimiothérapie, utilisables pour valider l'effet thérapeutique de nouveaux inhibiteurs. C'est pourquoi notre projet consiste à établir des modèles de cancer de la prostate résistants à la chimiothérapie, qui reproduisent les caractéristiques observées chez les patients. Une fois ces modèles établis, nous les utiliserons pour valider l'effet thérapeutique de certaines thérapies ciblées en association avec la chimiothérapie, avant de pouvoir proposer les associations de molécules les plus efficaces dans des essais cliniques chez l'homme.

Notre projet prévoit l'utilisation de 650 à 700 souris mâles immunodéficientes sur une durée de 5 ans. Nous avons limité les expériences en fonction des caractéristiques intrinsèques des lignées de cancer de prostate étudiées et constitué des groupes de souris permettant une analyse statistique plutôt que la répétition des expériences. Nos expériences sont planifiées pour que nous soyons capables de détecter des souffrances éventuelles, pour limiter la souffrance des animaux avec des traitements analgésiques adaptés aux procédures et pour arrêter les expériences avant d'atteindre les points limites. De plus, nous utilisons autant que possible la technique de suivi de la croissance tumorale par bioluminescence, qui est une technique non invasive et non douloureuse et qui permet d'obtenir des résultats quantitatifs sur un nombre limité de souris. Les tumeurs sont prélevées en fin d'expérience sur les animaux euthanasiés pour être analysées par plusieurs techniques afin d'exploiter au mieux les expériences. Dans un contexte où le microenvironnement de la tumeur et les influences hormonales peuvent jouer un rôle important, ces expériences chez l'animal sont aujourd'hui indispensables pour valider les résultats obtenus in vitro, avant de tester de nouveaux traitements chez l'homme.

3465. L'allergie est devenue aujourd'hui un problème de santé publique majeur dans nos pays. Les manifestations peuvent être variables, pouvant conduire à des réactions allergiques graves, voir mortelles. Les traitements de l'allergie restent limités, notamment dans le cadre de l'allergie alimentaire.

Nous développons dans l'équipe de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques de l'allergie alimentaire. Deux axes sont envisagés, et pourront être associés. Le premier vise à induire une tolérance face à l'antigène en administrant par voie orale ou sublinguale l'antigène vectorisé dans des nanotransporteurs (de type VLPs). Le second vise à activer et amplifier la population de lymphocytes T régulateurs, cellules capables de contrôler les réponses immunitaires indésirables. Pour cela, nous administrerons une molécule (l'IL-2 faible dose) capable d'activer spécifiquement cette population. Ces thérapies pourront être combinées, et testées comme des traitements préventifs ou curatifs de l'allergie. L'efficacité des thérapies sera évaluée chez la souris dans un modèle d'allergie alimentaire spécifique de l'ovalbumine. Pour cela, les souris seront sensibilisées par injection de l'ovalbumine en présence d'adjuvant puis 2 semaines plus tard l'allergie est induite en administrant quotidiennement l'ovalbumine par voie orale. L'allergie provoque alors une diarrhée et une diminution de température chez les souris sensibilisées. Nous évaluerons si le traitement permet de prévenir ces signes cliniques de l'allergie.

Pour réaliser ce projet, 2700 souris sont nécessaires sur les 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures

expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Par exemple, seuls les stratégies validées in vitro seront testées chez l'animal. Des études exploratoires sur un petit nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un nombre plus important d'animaux. De plus, la combinaison des stratégies thérapeutiques sera réalisée uniquement si celles-ci montrent des effets indépendamment.

3466. Le projet vise à réaliser un modèle de Syndrome de Brugada dans un contexte physiologique d'animal entier. Le Syndrome de Brugada est caractérisé par des arythmies cardiaques héréditaires mortelles issues d'anomalies de fonctionnement du canal sodique cardiaque, Nav1.5, codé par le gène SCN5A. Des mutations du canal Nav1.5 ont été identifiées chez des patients Brugada et leur caractérisation in vitro en système hétérologue a mis en évidence un effet de suppression du courant sodique natif. Un modèle murin de surexpression de ces mutations permettra d'étudier in vivo leurs conséquences physiopathologiques et de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués.

La surexpression se fera en utilisant des vecteurs viraux de type AAV portant le canal sodique cardiaque muté par mutagenèse dirigée. Ces vecteurs seront injectés par voie systémique à des souris. Les conséquences sur la fonction cardiaque et le courant sodique seront déterminées respectivement par enregistrements échocardiographiques et électrocardiographiques sur l'organisme entier et par la technique de patch-clamp sur des cardiomyocytes isolés. Des études biochimiques et immunohistochimiques sur tissus isolés permettront l'étude au niveau moléculaire des conséquences de ces mutations.

De plus, nous avons identifié un peptide N capable de faciliter le trafic du canal sodique à la membrane dans un modèle de cellules en culture. Nous souhaitons confirmer l'effet in vivo de cette approche thérapeutique.

Nous utiliserons au maximum 120 souris C57BL6 en deux ans pour la réalisation de ce projet.

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

1) Afin de réduire au maximum la douleur chez les animaux utilisés, nous anesthésierons les souris avant d'injecter les virus par voie systémique, ce qui évite la chirurgie cardiaque lourde liée à une injection intracardiaque.

2) Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons les contrôles les mieux adaptés et les virus ne seront injectés qu'après avoir été titrés in vitro et lorsque ce titre sera suffisant pour obtenir un effet in vivo.

3) Le myocyte cardiaque adulte ayant atteint un état de différenciation terminale, il ne se divise pas, il ne peut être conservé en culture primaire plus de quelques jours et il ne peut être transfecté par les agents de transfection non viraux. D'autre part, aucun modèle d'expression in vitro ne reproduit les conditions physiologiques spécifiques du cardiomyocyte (expression de protéines spécifiques dans des domaines subcellulaires spécifiques). De ce fait, l'utilisation d'animaux ne peut être remplacée par des modèles d'expression in vitro ou ex vivo.

Pour conclure, ce modèle murin de syndrome de Brugada constituera un excellent outil pour appréhender les mécanismes physiopathologiques des maladies dues au dysfonctionnement du canal sodique cardiaque et permettra d'évaluer, in vivo, les conséquences de mutations dans ce canal.

3467. La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique intestinale (MICI) qui touche entre 100000 et 150000 patients en France et près de 1 million en Europe. La physiopathologie de la MC reste mal connue, mettant en jeu une dysrégulation du système immunitaire intestinal en réponse à des antigènes d'origine bactérienne chez des personnes génétiquement prédisposées.

Soixante-dix pourcents des malades subiront une intervention chirurgicale au moins une fois dans leur vie et près de la moitié des malades opérés nécessiteront d'autres interventions chirurgicales pour récides des lésions digestives de MC.

Il n'existe pas de traitement curatif de la MC. Les molécules actuellement disponibles ont pour objectif de traiter les poussées inflammatoires et/ou de prévenir leurs apparitions. Le traitement chirurgical, avec résection des segments digestifs pathologiques, survient le plus souvent après échec du traitement médicamenteux et ne protège pas de la récidence de la MC. Les mécanismes sous-jacents à la récidence post-chirurgicale sont mal compris même si différentes hypothèses, comme l'obstruction des canaux lymphatiques, ont été avancées. Par ailleurs, il n'existe pas de modèle animal fiable et reproductible qui permettrait l'étude d'une telle récidence. Or, un tel modèle animal permettrait i) de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de la récidence post-chirurgicale ii) d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans la MC.

Une cinquantaine de modèles de colite sont décrits chez les rongeurs, mais un seul d'entre eux concerne la récidence post-chirurgicale. Ce modèle de récidence post-chirurgicale a été décrit en 2011 chez la souris IL-10 KO, après résection iléo-caecale et anastomose iléo-colique. L'exposition à des germes digestifs provoque une inflammation sur l'intestin grêle en amont de l'anastomose en plus de l'inflammation colique. Les animaux nourris par une alimentation dépourvue de tout germe ne développent pas d'inflammation digestive que ce soit au niveau iléal ou au niveau colique. Ce modèle, est de réalisation difficile et n'a jamais été reproduit. Il nécessite la réalisation d'une anastomose par microchirurgie ainsi qu'une alimentation et une stabulation en environnement stérile. De plus, le taux de colites induites chez les souris IL-10 KO est très aléatoire selon les élevages.

Le modèle de colite induite chez le rat transgénique HLA B27 semble intéressant à plusieurs titres :

- colites facilement induites après inoculation par un germe spécifique (*Bacteroides vulgatus* (BV))

- stabulation en milieu non stérile

- animal plus gros que la souris ne nécessitant pas de micro-chirurgie

L'évaluation de la récidence inflammatoire intestinale post-chirurgicale n'a jamais été étudiée dans ce modèle.

Ainsi, l'objectif principal de ce travail de recherche sera de mettre au point un modèle de récidence post-chirurgicale de MC chez le rat transgénique HLA B27.

L'objectif secondaire sera d'évaluer dans ce modèle à l'aide du micro TEP scan :

- l'atteinte inflammatoire systémique associée,
- l'intensité et l'évolution de l'inflammation digestive dans le temps.

70 rats seront nécessaires pour réaliser l'ensemble de cette étude.

3468. Les infections cornéennes représentent une cause très importante de cécité dans le monde. Elles peuvent être dues à des bactéries, des virus (dont le plus fréquent est l'Herpès), des parasites (dont le plus fréquent est l'amibe tellurique), et des champignons. Leur sévérité étant le plus souvent liée au retard de la prise en charge et à la virulence de l'agent infectieux en cause il est important de l'identifier le plus rapidement possible. L'examen simple de l'ophtalmologiste ne permet le plus souvent pas d'identifier quel agent est en cause.

Actuellement le diagnostic de la cause de l'infection repose donc sur des examens de laboratoire de microbiologie à partir de prélèvements réalisés par grattage ou écouvillonnage de la surface de la cornée infectée. Tous ces examens ne sont évidemment pas disponibles sur toute la planète et, par ailleurs ils sont assez souvent mis en défaut car la quantité de matière prélevable sur la cornée est très limitée et certains agents (parasites et champignons) très difficiles à révéler.

La microscopie confocale in vivo (MCIV) est une méthode d'examen NON INVASIVE, réalisée sur le patient après simple anesthésie de la cornée par le collyre habituel que l'ophtalmologiste utilise lors de tout examen. Elle permet d'obtenir une véritable biopsie optique permettant une analyse microscopique SANS PRELEVEMENT.

Nous pensons cependant que la MCIV pourrait obtenir de meilleurs résultats en utilisant des marqueurs SPECIFIQUES des microorganismes responsables des infections cornéennes et ainsi identifier EN DIRECT « AU LIT DU MALADE » l'agent infectieux en cause pour proposer au plus vite le traitement adapté.

Le but du travail soumis au CEEAL-UJM est d'étudier d'un nouveau marqueur fluorescent spécifique à l'infection bactérienne. Nous avons pour cela besoin de les tester sur des modèles animaux d'infection cornéenne. Le modèle lapin est de loin le plus adapté car l'anatomie de sa cornée est proche de celle de l'homme, ce qui la rend examinable par le microscope confocal in vivo et permet un suivi facile de son état pour les animaliers et les expérimentateurs. Le modèle d'infection est une kératite bactérienne, c'est à dire une infection des cellules superficielles de la cornée SANS diffusion au reste de l'organisme. La quantité de bactéries est faible et la kératite bactérienne n'est pas dangereuse pour l'homme.

Au total, 6 lapins sont potentiellement prévus pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs et prend en compte le risque que certains animaux puissent être exclus au cours du projet. Ce projet doit obligatoirement être mis en œuvre in vivo afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme, et il est éthiquement inconcevable de mettre en place un tel projet directement chez l'homme. Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (lapin sous anesthésie générale pendant l'inoculation de l'agent infectieux, traitement antalgique après infection, suivi quotidien dans les 3 jours suivants l'injection), des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toutes souffrances inutiles à l'animal afin de le sortir le plus rapidement possible de l'expérimentation et donc de le soulager. De même, toutes les mises à mort des animaux seront effectuées de façon à limiter au maximum le stress et la douleur.

3469. Le muscle strié squelettique est le tissu le plus abondant de l'organisme. Il possède de formidables capacités de régénération rendues possible grâce à une population de cellules souches appelées cellules satellites musculaires. Les causes de dégénérescence musculaire sont nombreuses : traumatisme, infection, anomalie endocrinienne, intoxication, anomalie génétique, etc... Bien que la régénération musculaire conduise finalement à la reformation d'un tissu parfaitement organisé et fonctionnel, les mécanismes exacts et les différentes étapes de cette régénération sont encore mal connus, notamment en raison de la grande diversité et des interconnexions complexes entre les différentes populations cellulaires intervenant dans ce processus.

L'objectif de notre projet est la compréhension des mécanismes de régénération du tissu musculaire, et plus particulièrement les interactions entre les différents types cellulaires lors de ce processus.

Bien que la caractérisation des mécanismes cellulaires et moléculaires soit réalisée in vitro chaque fois que cela est possible, le recours à un organisme entier est indispensable pour étudier dans sa totalité le processus de régénération musculaire. Des modèles très pertinents existent chez la souris, en particulier de nombreuses lignées transgéniques qui ont permis de réaliser des découvertes fondamentales sur les mécanismes du développement et de la régénération musculaires. Nous allons les utiliser dans ce projet pour étudier la régénération à la suite de différentes lésions musculaires.

Au total, notre projet utilisera 4080 souris sur 5 ans, dans 4 procédures de sévérité modérée. Pour chaque expérimentation, nous mettrons en œuvre : (1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, (2) des procédures d'anesthésie pour toutes les manipulations qui le nécessitent et (3) un suivi très rapproché des animaux pour détecter précocement tout signe de souffrance ou de mal-être.

Les résultats de ces recherches auront non seulement un impact direct sur la compréhension de la régénération musculaire et ainsi sur la prise en charge des patients à l'hôpital et sur la mise au point de stratégies thérapeutiques innovantes mais ils pourront aussi être extrapolés pour la compréhension des mécanismes de régénération d'autres tissus, une grande partie des étapes de régénération étant très probablement commune à différents tissus et organes.

3470. La gestion de la douleur postopératoire, longtemps négligée, occupe actuellement une place prépondérante après une intervention chirurgicale. L'analgesie par bloc nerveux périphérique est largement reconnue pour son efficacité per et postopératoire. Un des problèmes de l'injection unique d'anesthésique local est sa durée d'action limitée. Ainsi, les cathéters nerveux périphériques sont fréquemment utilisés pour prolonger l'analgesie, lorsque la douleur a une durée prévisible

supérieure à 24 heures et/ou pour la chirurgie articulaire nécessitant une rééducation fonctionnelle immédiate. Le recours à ces techniques permet de diminuer la consommation postopératoire d'antalgiques (et notamment de morphine), diminuant ainsi l'incidence des effets secondaires (prurit, nausées, vomissements, somnolence ...), et contribue à améliorer la guérison, avec une mobilisation plus rapide du patient, des séjours hospitaliers plus courts, et des coûts de santé réduits.

L'élaboration de formes retardées d'anesthésiques locaux semble une alternative séduisante pour prolonger la durée de l'analgésie. Aux Etats-Unis, la FDA (2012) a donné son accord pour l'utilisation de l'Exparel® (Bupivacaine sous forme liposomale), un anesthésique local à libération prolongée. Cette molécule est autorisée en infiltration, en post-opératoire de la chirurgie d'hallux valgus et lors de la chirurgie hémorroïdaire.

Un nouveau vecteur, le Medingel®, est basé sur un gel de polymères (PGE/PLA) dans lequel l'anesthésique local est piégé. Ainsi, la libération progressive de l'anesthésique local lors de la dégradation du polymère pourrait garantir, après une injection unique, un contrôle prolongé de la douleur post opératoire.

Le principal objectif de ce projet est d'évaluer la sécurité d'emploi du Gel PEG/PLA (Medingel®) de bupivacaine à libération prolongée en terme de toxicité locale, en particulier musculaire.

Une analyse de la toxicité musculaire liée aux différentes formes galéniques d'anesthésiques locaux sera effectuée chez le rat Wistar adulte sain. 3 groupes de 10 animaux seront donc constitués afin de comparer la toxicité locale de la bupivacaine administrée soit par la technique de référence actuelle, le cathéter péri neural d'analgésie continue (technique de référence) soit par injection unique péri neurale du gel de Bupivacaine à libération prolongée. Le troisième groupe est caractérisé par l'injection unique de gel "natif" c'est-à-dire sans produit actif. L'évaluation de la toxicité musculaire sera réalisée à 72 heures et à 21 jours par des analyses biochimiques et histologiques.

3471. Un domaine de recherche en développement est la détermination des mécanismes possibles du syndrome d'hypersensibilité aux champs électromagnétiques (CEM) de la téléphonie mobile. Des symptômes subjectifs en lien avec l'homéostasie générale (migraines, fatigue, problèmes de sommeil) sont décrits par les patients qui s'auto-diagnostiquent hypersensibles aux CEM. L'incidence de ce syndrome est variable selon les pays et atteint jusqu'à 5% en Suisse.

L'une des fonctions complexes de la physiologie intégrée, garante de l'homéostasie générale de l'individu est la nociception. Une perturbation de la nociception est un mécanisme suspecté dans les syndromes d'hypersensibilité aux facteurs environnementaux (chimiques, odeurs,...). Ces agents pourraient sensibiliser les processus de la nociception qui, en retour pourraient sous-tendre les symptômes du syndrome d'hypersensibilité lors d'expositions ultérieures aux mêmes agents. Par ailleurs, les périodes du développement qui précèdent l'âge adulte (stade juvénile, adolescence) sont caractérisées par des états biologiques potentiellement plus vulnérables aux expositions environnementales.

Ce projet pose l'hypothèse qu'une hypersensibilité des voies nociceptives pourrait rendre les organismes plus vulnérables en réponse à une exposition aux CEM du téléphone portable. Ce projet est novateur et se place dans une démarche exploratoire.

La réalisation de ce projet se fera en deux étapes. Tout d'abord, un modèle d'hypersensibilité nociceptive sera mis en place chez le rat adolescent. L'augmentation de la sensibilité à la douleur sera mesurée par un test comportemental visant à mesurer le temps que met l'animal à percevoir une stimulation thermique au niveau des pattes.

Dans un deuxième temps, afin de tester l'effet des CEM sur le seuil de perception de la douleur chez les rats sains et les rats rendus hypersensibles, des rats adolescents seront exposés à plusieurs niveaux de CEM au niveau de la tête (0, 0,4, 1,5 et 6 W/kg), puis ils seront testés pour leur réactivité en réponse à la stimulation thermique. Ces informations comportementales et l'analyse de l'intégrité des cerveaux après prélèvement permettront de comprendre si des expositions aux CEM du téléphone portable sont susceptibles de perturber l'une des fonctions physiologiques déterminantes pour l'homéostasie générale, les systèmes de perception de la douleur, chez des individus sains ou présentant une hypersensibilité nociceptive.

3472. La myasthénie grave est une maladie auto-immune rare. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine, situé sur la membrane post-synaptique à la jonction neuro-musculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la myasthénie. Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques et doivent être pris à vie.

Le trioxyde d'arsenic (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) est une molécule innovante utilisée avec grand succès comme traitement de deuxième intention de la leucémie promyélocytaire aiguë induisant une rémission complète de la maladie. Le trioxyde d'arsenic a aussi démontré une très bonne efficacité dans certains modèles animaux de maladies auto-immunes, tels que le lupus et des essais cliniques sur l'homme sont actuellement mis en œuvre.

Il existe un modèle animal de la myasthénie induit par l'injection de récepteur à l'acétylcholine purifié à partir d'organes électriques de poissons torpilles. Ce modèle permet d'évaluer les effets de nouveaux traitements. Nous voulons donc analyser les effets du trioxyde d'arsenic sur le modèle expérimental de la myasthénie chez la souris. Les expériences comprendront différents lots de souris induites pour la myasthénie et traitées ou non au trioxyde d'arsenic. Nous estimons avoir besoin de 200 souris C57bl/6 pour ce projet. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et obtenir des résultats statistiquement relevant avec le moins de souris possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris.

Le but de ce projet de recherche est d'évaluer l'efficacité du trioxyde d'arsenic dans le traitement de la myasthénie induite chez la souris. Cette étape est nécessaire avant de proposer des essais cliniques sur l'homme.

3473. Malgré leur efficacité dans le traitement de divers cancers, l'utilisation des anthracyclines est limitée par leurs effets cardiotoxiques. La prévention de cette cardiotoxicité reste un problème crucial en oncologie clinique. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets cardioprotecteurs éventuels de deux analogues synthétiques des flavaglines dans un modèle de cardiotoxicité induite par la doxorubicine chez le rat. Le modèle animal est le seul permettant une évaluation des effets des flavaglines sur la mortalité et la dysfonction cardiaque induite par la doxorubicine ; l'identification des mécanismes moléculaires des effets protecteurs éventuels des flavaglines sera ensuite réalisée sur des modèles cellulaires. Les flavaglines sont une famille de composés naturels qui présentent des effets cytoprotecteurs puissants, à la fois *in vitro* et *in vivo*, en particulier au niveau des neurones et des cardiomyocytes.

Quatre-vingt deux rats au maximum seront utilisés au total, répartis dans 4 lots : contrôle (n=10), doxorubicine (n=24), doxorubicine + FL3 (n=24) et doxorubicine + FL37 (n=24). Ce nombre tient compte de la mortalité induite par la doxorubicine (de l'ordre de 50% selon la bibliographie) et est nécessaire à une évaluation statistique fiable. L'étude sera réalisée en trois séries. Une analyse statistique sera réalisée à l'issue des deux premières séries. Ainsi, si ces deux séries permettent d'obtenir des résultats significatifs ou proches de la significativité, le nombre d'animaux dans la dernière série sera diminué afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

3474. Les rétinites pigmentaires forment un ensemble de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence des photorécepteurs de la rétine qui entraîne la cécité. Elles touchent une proportion importante de la population (environ 1/4000 dans la population générale), mais présentent une grande hétérogénéité génétique : actuellement, plus d'une cinquantaine de gènes dont la mutation entraîne cette pathologie ont été identifiés. Récemment, il a été montré que le gène *IMPG2*, qui est exprimé par les photorécepteurs et code une protéine de leur matrice extracellulaire, est à l'origine de formes récessives de rétinites pigmentaires chez l'homme.

Afin de déterminer si les rétinites pigmentaires dues aux mutations d'*IMPG2* sont une cible potentielle pour une thérapie par transfert de gène, nous avons créé un modèle pour cette maladie par invalidation du gène de souris. L'objectif de ce projet est dans un premier temps de caractériser la décours de la dégénérescence chez la souris, puis dans un deuxième temps de tester une intervention thérapeutique consistant à restaurer l'expression d'*IMPG2* dans les photorécepteurs par injection d'un vecteur AAV. Cela nécessitera l'utilisation d'environ 140 souris sur la période de trois ans pour laquelle le projet est prévu. Nous avons pris en compte la règle des 3Rs pour ce chiffre. Il ne nous sera pas possible d'avoir des données statistiquement significatives avec moins d'animaux. Les méthodologies utilisées dans ce projet impliquent la notion de points limites (critères d'interruption en cas de souffrance des animaux).

3475. Les rétinites pigmentaires forment un ensemble de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence des photorécepteurs de la rétine qui entraîne la cécité. Elles touchent une proportion importante de la population (environ 1/4000 dans la population générale), mais présentent une grande hétérogénéité génétique : actuellement, plus d'une cinquantaine de gènes dont la mutation entraîne cette pathologie ont été identifiés. Les mutations récessives peuvent être traitées par thérapie génique en apportant *in situ* une copie saine du gène muté. Les stratégies de traitement sont moins évidentes pour les mutations à caractère dominant qui nécessite non seulement l'apport du gène sain, mais aussi l'élimination du produit toxique de l'allèle muté.

Avec le présent projet de recherche, nous testerons *in vivo* une nouvelle stratégie capable d'apporter une solution thérapeutique dans le cas de mutations dominantes par réparation de l'ARNm dans les cellules malades. Nous utilisons la rhodopsine comme modèle car les mutations de ce gène sont les plus représentées dans les formes dominantes de rétinites pigmentaires. Dans un modèle cellulaire, nous avons montré que notre outil thérapeutique est capable de réparer jusqu'à 30% des ARNm. Nous devons maintenant valider ce résultat *in vivo* dans les contextes cellulaires des photorécepteurs, et démontrer le bénéfice thérapeutique dans un modèle de rétinite pigmentaire.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité en provenance d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale de l'œil en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules.

Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « léger » pour l'imagerie à « modéré » pour les procédures chirurgicales. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir au bien-être des animaux.

3476. La souris MTLE est un modèle d'épilepsie chronique focale obtenu par injection d'acide kaïnique (KA) dans l'hippocampe dorsal droit de souris C57bl6 et mise en place d'électrodes sous anesthésie générale. Après un état de mal focal de 15-18h suivi par une phase d'épileptogénèse de 16 à 21 jours, la souris présente un état épileptique chronique caractérisé par des crises focales (hippocampiques) récurrentes et spontanées. Dans le cadre d'un projet européen (FP7), nous étudions le rôle de plusieurs voies métaboliques qui accompagnent l'épileptogénèse dans ce modèle. Nos premiers résultats en transcriptomique et protéomique montrent une sur-expression de plusieurs facteurs de transcription qui pourraient jouer un rôle critique dans la progression de cette maladie et constituer des cibles thérapeutiques intéressantes. Il devient donc indispensable d'examiner les effets de substances qui bloquent certaines des protéines suspectées, sur le développement de la maladie. Pour chaque substance testée, nous prévoyons de traiter quotidiennement les animaux (6 contrôles et 6 kainate)

pendant les 3 semaines qui suivent l'injection intrahippocampique et d'évaluer les effets par électroencéphalographie. Un total de 144 souris seront nécessaires pour examiner 12 molécules différentes dont certaines sont en cours de développement par les partenaires industriels impliqués dans le projet européen.

D'après notre expérience, ce type de procédure n'est pas létal et ne nécessite pas de prévoir plus de 12 animaux par traitement à ce stade. De plus, ce nombre est suffisant pour réaliser les analyses statistiques nécessaires pour déterminer l'efficacité d'un traitement. L'interruption des expériences en cours pourra toutefois intervenir au cours de la chirurgie (dans le cas où la température de l'animal ne serait pas maintenue par exemple) ou lors de la période de traitement en cas d'apparition de signes indicatifs de gêne ou de douleur persistants (apparence du pelage, perte de poids supérieure à 20%, prostration) et/ou des signes de douleur (réactivité anormale à la manipulation, vocalisations). Des souris mâles adultes seront utilisées, comme lors de nos études précédentes afin de pouvoir effectuer des comparaisons.

Cette étude devrait permettre de déterminer l'efficacité de traitement chronique en début d'épileptogenèse pour traiter l'épilepsie mésiotemporale. Cependant, il est impossible d'étudier l'épileptogenèse chez l'homme et aucun modèle cellulaire ou mathématique ne permet actuellement d'étudier les effets de composés sur cette phase de la maladie.

3477. La sclérose en plaques (SEP) affecte le système nerveux central et est la conséquence d'une attaque incontrôlée par le système immunitaire de la gaine de myéline entourant les fibres nerveuses. Cette gaine qui est essentielle à la propagation du signal nerveux, est alors détruite, entraînant l'apparition de certains symptômes tels que des handicaps moteurs, des troubles de la vue, une faiblesse musculaire ou des engourdissements. Une des étapes clés dans l'apparition de la maladie est le passage des cellules immunitaires du sang vers le SNC. Ce passage est strictement contrôlé dans les conditions normales et notre projet vise à étudier les mécanismes qui contrôlent la migration des cellules immunitaires dans un modèle expérimental murin de SEP, l'EAE. Le modèle de l'EAE permet d'étudier la maladie dans un organisme entier qui ne peut pas être dupliqué en utilisant des tissus seuls. Nous avons suivi la règle des 3R en introduisant des points limites à notre protocole. En revanche, et à notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la sclérose en plaques. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire et un total de 60 souris seront nécessaires pour ce projet.

3478. L'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés a conduit à une augmentation des troubles musculo-squelettiques, comme l'ostéoporose, l'arthrose et l'ostéomyélite.

Les nouveaux médicaments ont été développés pour traiter ces maladies. Cependant, une question clé est de maximiser l'accès des drogues à des sites spécifiques de l'os et de contrôler la libération du médicament, afin de maintenir le niveau de concentration désirée de la drogue pendant de longues périodes. Le développement de matériaux qui sont capables de libérer des médicaments avec une cinétique prévisible, de cibler un tissu spécifique avec une concentration locale contrôlée et de limiter les effets systémiques indésirables, est donc d'un intérêt majeur. Les matériaux inorganiques comme les céramiques de phosphate de calcium sont largement utilisés dans le développement d'implants, et sont également de bons candidats comme supports des antibiotiques, car ils permettent à la fois de participer à la réparation osseuse et au traitement de l'infection locale.

Dans le cadre d'un projet de recherche avec des partenaires biologistes et chimistes, le développement d'une biocéramique est envisagé comme vecteur de délivrance d'un antibiotique pour améliorer la reconstruction des pertes osseuses suite à une infection bactérienne de l'os.

84 rats Wistar RjHan sont prévus pour l'expérimentation en plusieurs étapes. Aucune autre que ce modèle in vivo ne permettra l'évaluation de la céramique développée comme vecteur d'antibiotique.

Une ostéomyélite sera induite au niveau de genou des rats par l'injection des bactéries. Grâce à une modification génétique de ces bactéries, leur prolifération peut être suivie par imagerie ce que permettra de réduire le nombre des animaux au maximum.

Une fois l'ostéomyélite est constatée, la céramique apportant l'antibiotique sera implantée dans l'os infecté et les animaux seront suivis juste à leur guérison.

L'induction d'une ostéomyélite est considérée comme un protocole douloureux, mais les animaux restent sur traitement antidouleur pendant tous les étapes pour réduire au maximum des contraintes liées à ce protocole. Les animaux seront manipulés dans une animalerie spécialisée pour éviter des contaminations avec des bactéries pathologiques et des animaux infectés.

3479. Notre équipe travaille sur la maladie de Huntington (MH) ; une maladie génétique et neurodégénérative. Les principales manifestations cliniques de la MH sont des mouvements choréiques, un déficit cognitif et des troubles psychiatriques. La neuropathologie de la MH affecte préférentiellement le striatum, une structure sous corticale du cerveau, au stade précoce de la maladie mais peut s'étendre progressivement à d'autres structures cérébrales. Il n'existe aucun traitement curatif de la MH si bien que la maladie progresse inexorablement vers la mort. Notre équipe travaille depuis de nombreuses années sur la physiopathologie de la MH afin de mieux comprendre le processus neurodégénératif de cette maladie et proposer des cibles moléculaires thérapeutiques.

Plusieurs modèles murins génétiquement modifiés de la MH ont été créés à des fins de recherches fondamentales et cliniques. Nous travaillons spécifiquement sur 2 modèles murins transgéniques afin de tester le rôle neuroprotecteur de plusieurs cibles moléculaires identifiées in vitro sur des modèles de neurones en culture. Ces agents neuroprotecteurs pouvant faire l'objet

d'une étude clinique chez l'homme, il est tout d'abord essentiel d'établir une étude pré-clinique dans un modèle animal de la MH. L'utilisation des modèles murins génétiquement modifiés reproduisant certains symptômes et des marqueurs neuropathologiques observés chez l'homme est essentielle afin de valider ou au contraire invalider les résultats obtenus in vitro. L'expérimentation animale sur une cinquantaine de souris par modèle permettra de déterminer si les cibles thérapeutiques identifiées in vitro présentent aussi une action neuroprotectrice in vivo. Le nombre total d'animaux utilisé est fixé à 150. Des tests comportementaux locomoteurs sont réalisés chez les 2 modèles murins de la MH ayant reçu l'agent neuroprotecteur. Pour chaque test locomoteur, le nombre d'animaux requis est celui qui permet la réalisation d'analyses statistiques c'est à dire une dizaine d'animaux par groupe. Le sacrifice des souris se fera par injection d'une surdose d'anesthésique pour les études neuropathologiques ou par dislocation cérébrale pour les études biochimiques et moléculaires. En post-mortem, la neuropathologie est étudiée sur les cerveaux afin de préciser les effets bénéfiques des agents thérapeutiques à travers l'étude de marqueurs de la MH. Enfin, dans l'objectif de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour la MH, la non toxicité à long terme de l'agent neuroprotecteur administré à des souris doit être scrupuleusement étudiée. Pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle au moins quotidiennement par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, ou de retirer les animaux morts des salles d'hébergement. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique).

3480. Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et sont associées le plus souvent à un très mauvais pronostic. Ils sont classés par l'OMS en 3 catégories différentes en fonction de leurs caractéristiques histopathologiques. On distingue ainsi les oligodendrogliomes (de grade II et III), les astrocytomes (grade I à IV) et les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes (grade II ou III). Cette classification malgré son apparente simplicité manque de reproductibilité et il est essentiel dans la prise en charge du patient de prendre en compte les informations apportées par les marqueurs moléculaires. En effet il existe de nombreuses altérations associées à différents sous-groupes de gliomes. Dans ce projet nous nous intéresserons plus particulièrement aux oligodendrogliomes qui sont dans leur grande majorité (70%) codéletés des bras chromosomiques 1p et 19q, mutés sur le gène CIC (19q), muté sur le gène IDH1 ou IDH2 et muté sur le promoteur du gène hTERT. L'ensemble de ces altérations est extrêmement fréquent dans ce sous-groupe de gliomes et particulièrement associé. Ceci suggère qu'elles pourraient avoir un rôle essentiel dans la genèse des oligodendrogliomes qui est à ce jour encore très mal comprise.

Nous proposons donc par ce projet d'une part d'étudier l'impact de ces altérations individuellement et d'autre part de les associer pour déterminer la combinaison minimale nécessaire à la formation d'oligodendrogliomes, en créant des lignées transgéniques de souris. Par ailleurs nous pourrions grâce aux différents modèles murins créés déterminer la fonction de la protéine CIC qui est pour l'instant en grande partie incomprise chez les mammifères et qui pourrait avoir un rôle essentiel dans le développement à la vue de son implication dans la voie de signalisation de l'epidermal growth factor (EGF).

Nous espérons à l'issue de ce projet pouvoir savoir quelles sont les altérations essentielles à la formation et au maintien des oligodendrogliomes. De plus ce projet devrait permettre l'établissement de nouveaux modèles murins d'oligodendrogliomes très proches de ceux observés chez les patients. Ils pourront être alors utilisés dans des phases précliniques d'évaluation de thérapies ciblées visant spécifiquement les altérations présentes dans ces tumeurs. Ce projet devrait nécessiter sur trois ans l'utilisation de 660 souris (dont 560 transgéniques et 100 souris C57Bl6/J) qui seront toujours anesthésiées et analgésées avant toutes procédures.

Les efforts fournis afin de réduire, raffiner et remplacer sont : (i) les cellules cérébrales modifiées chez l'animal seront fluorescentes nous permettant de suivre leur développement éventuel en tumeur en temps réel à l'aide d'un détecteur de fluorescence sans sacrifier les animaux de manière séquentielle et réduisant ainsi le nombre d'animaux par expérience, (ii) des expériences in vitro seront réalisées pour permettre d'identifier rapidement les altérations qui devraient entraîner une transformation tumorale des cellules saines. Ceci nous permettra de limiter le nombre de combinaisons testées directement sur l'animal. (iii) le nombre d'animaux par lot expérimental a été réduit au nombre minimum d'individus nous permettant de répondre à notre question de départ.

3481. *Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie strict, sporulante, et première cause de diarrhée nosocomiale bactérienne chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (> 24000 cas par an, 14 % de formes compliquées dont la plus connue est la colite pseudomembraneuse et marquée par 3% de mortalité). La contamination se fait à partir des spores, formes de résistance et hautement contagieuses de la bactérie, largement présentes dans l'environnement des services de soins hospitaliers. Les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent évoluer sur un mode épidémique avec la survenue de cas groupés d'infection dans les services de soins puis dans l'ensemble de l'établissement voire sur tout un territoire de santé (exemple de l'épidémie qui a touché tout le Nord de la France en 2006), et représente un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et du surcoût des soins associés. Malgré des traitements antibiotiques généralement efficaces, les récurrences des infections à *C. difficile* sont fréquentes (environ 20%) et des résistances aux antibiotiques apparaissent.

Physiopathologie :

La bactérie produit des toxines qui sont majoritairement responsables des signes cliniques et des lésions observées dans l'intestin. Cependant, d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de l'infection, au cours de la première étape qui

correspond à la colonisation du tube digestif de l'hôte par *C. difficile*. Notre laboratoire s'est spécialisé dans l'étude de cette étape de colonisation et travaille notamment sur le rôle de différentes protéines de surface dans cette étape importante d'implantation de la bactérie, les processus d'adaptation de la bactérie à l'hôte, et le rôle de la formation de biofilm.

Rationnel du projet proposé et perspectives :

Différentes protéines de surface impliquées dans cette colonisation ont été caractérisées. Du fait de la localisation intestinale de cette infection, le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre des protéines de surface par une vaccination par voie muqueuse peut être une stratégie efficace dans la prévention ICD.

L'objectif de cette étude est de réaliser des essais d'immunisation passive à l'aide d'anticorps spécifiques de différentes protéines de surface de *C. difficile*. Ces essais seront réalisés dans un modèle souris, animal peu sensible aux infections à *C. difficile* permettant de mettre en évidence l'effet protecteur des anticorps vis-à-vis de la colonisation intestinale de *C. difficile*.

L'identification et la caractérisation des facteurs de virulence nécessaires à la colonisation de l'hôte est un préalable indispensable à l'identification de nouvelles stratégies de lutte contre les infections à *C. difficile* incluant à la fois des schémas de prévention mais aussi le développement de nouvelles cibles thérapeutiques (antibiotiques, immunisation, ...) visant à empêcher cette étape précoce de colonisation.

Des expériences *in vitro* ont préalablement prouvé l'efficacité de ces anticorps afin de minimiser le recours inutile à un trop grand nombre d'animaux. Cependant des tests dans un modèle souris sont nécessaires pour confirmer l'efficacité de ces anticorps dans un modèle complexe *in vivo* chez l'animal. Afin de conclure sur ces expériences sans avoir besoin de les renouveler, un minimum de 8 souris par groupe ( $n=5$ ) est nécessaire pour obtenir suffisamment de puissance statistique soit 200 animaux sur l'ensemble des essais programmés.

3482. Ce projet a pour but d'étudier le rôle de l'expression astrocytaire de  $ROR\alpha$ , dans les interactions de l'astrocytes avec la microglie qui ne l'exprime pas. Ces 2 types de cellules non neuronales du système nerveux central (SNC) sont très réactives aux variations de l'environnement et à l'état des neurones. Elles sont impliquées dans la la réaction inflammatoire mise en place en réponse à tous types d'agression du SNC (infections, trauma, ischémie), et à la réaction gliale associée aux maladies neurodégénératives. Le projet repose essentiellement sur une approche *in vitro* car il s'appuie sur des données acquises lors d'une précédente étude réalisée *in vivo*. La stratégie est de déterminer les effets de la perte de  $ROR\alpha$  sur l'astrocyte lui-même et sur ses interactions avec la microglie dans un contexte inflammatoire. Deux modèles *in vitro* d'inflammation sont utilisés : sur cultures de cellules et sur des tranches de cerveau dites organotypiques.

Les expériences sont donc effectuées sur des cultures primaires d'astrocytes et de microglie isolés ou en co-cultures et sur des cultures organotypiques provenant de souris déficientes pour  $ROR\alpha$  ou dont la délétion est astrocyte-spécifique. Les cultures, qu'elles soient primaires ou organotypiques, sont préparées à partir de cerveaux en fin de développement (pour des raisons de rendement) donc de nouveau-nés âgés de 2 ou 5 jours. Après traitement, la réaction des cellules est analysée au niveau moléculaire par les techniques classiques d'immunocytochimie et de biochimie (western blot et RT-PCR en temps réel). Certaines de ces techniques impliquent une importante quantité de cellules pour être menée à bien. Nous avons évalué le nombre maximum de portées nécessaire à 26/an correspondant à 208 nouveau-nés/an pendant 3 ans dans l'hypothèse où toutes les approches (immunocytochimie et biochimie) sont réalisées.

Il n'y a pas d'alternative envisageable à l'utilisation de souriceaux nouveau-nés dans le cadre des objectifs de notre projet. Afin de limiter le nombre d'animaux, chaque expérience est minutieusement préparée afin de l'optimiser. De manière générale, elle s'inscrit dans une logique fondée sur des résultats antérieurs qui en valident l'intérêt et qui sont présentés et discutés lors de réunions de laboratoire. Par ailleurs, le nombre d'animaux utilisé est adapté de façon à ce que la validité de l'expérience ne puisse être mise en cause et l'expérience est conçue en fonction du nombre de nouveau-nés disponibles. Lorsque l'expérience est fixée, un protocole détaillé est rédigé dans lequel le but les résultats attendus et le déroulement temporel de l'expérience sont explicités.

Dans le cadre de ce projet, il n'y a pas d'expérimentation sur l'animal vigile, les nouveau-nés utilisés ne sont que des pourvoyeurs de cellules qui sont mises en culture. Les nouveau-nés sont traités avec attention et des mesures d'enrichissement sont adoptées dès la séparation d'avec leurs progéniteurs et pendant leur manipulation afin de limiter l'angoisse/l'anxiété liée au changement de milieu. En ce qui concerne les progéniteurs, les conditions de stabulation, milieu enrichi par l'addition d'un nid végétal dans la cage, contribue à atténuer le stress généré par le retrait des portées.

3483. Les méningites bactériennes touchent principalement le nouveau-né (incidence 30 fois plus élevée que dans la population totale). Ces infections graves provoquent le décès dans 10% à 15% des cas et laissent des séquelles dans 20 à 50% des patients.

*Streptococcus agalactiae* (GBS) et *Escherichia coli* sont les principales bactéries responsables des cas de méningite chez le nouveau-né alors qu'elles sont la plupart du temps non pathogènes pour l'adulte. Les raisons pour lesquelles les nouveau-nés sont particulièrement sensibles à ces bactéries et comment ces bactéries infectent les nouveau-nés, se disséminent dans le système sanguin et traversent la barrière cérébrale sont des questions auxquelles seules des réponses partielles ont été apportées.

Le but de ce projet est de comprendre la physiopathologie et les mécanismes de l'infection du nouveau-né par GBS et *E. coli*, depuis la colonisation du nouveau-né jusqu'au passage de la barrière hémato-encéphalique par ces bactéries. Cette étude nécessite donc le recours à l'approche *in vivo* car il n'est pas actuellement possible de reproduire dans un modèle *in vitro* la complexité de ce type d'infection qui se dissémine dans différents tissus de l'organisme.

Différentes lignées de souris mutées pour des gènes suspectés d'intervenir dans la sensibilité néo-natale seront infectées par GBS et E. coli. La dissémination bactérienne sera suivie à partir de sang et d'organes infectés tels que le cerveau, qui seront prélevés après sacrifice des animaux.

Ce projet qui durera 5 ans nécessitera l'utilisation de 2682 souris sur 5 ans, dont 1980 dans 3 procédures de gravité sévère, 504 dans une procédure de gravité modérée et 198 dans une procédure sans réveil. Les effectifs nécessaires ont été calculés sur la base de tests statistiques en fonction des paramètres mesurés. Les animaux seront rigoureusement suivis, en particulier après leur infection, pour détecter précocement des signes cliniques justifiant l'interruption de la procédure. L'usage de l'anesthésie sera généralisé autant qu'il sera compatible avec les mécanismes étudiés.

Ce projet permettra d'approfondir nos connaissances sur ces infections très graves et souvent mortelles et contribueront à améliorer les traitements.

3484. Une des propriétés les plus intrigante des progéniteurs d'oligodendrocytes (PO) NG2+ est leur capacité à recevoir des synapses glutamatergiques et/ou GABAergiques, à la fois dans la substance grise et la substance blanche. Bien que la ou les fonctions des synapses entre neurones et PO reste(nt) inconnue(s), plusieurs équipes ont suggéré qu'elles permettent aux neurones de réguler la myélinisation de leur axone d'une manière dépendante de l'activité. Nous avons nous-mêmes récemment démontré que ces synapses étaient formées de novo et activement régulées au cours du processus de remyélination du corps calleux chez la souris adulte. Cependant, il est aussi envisageable que ces synapses influencent également le comportement précoce de ces cellules au cours du développement (spécification, prolifération, migration). Malheureusement, très peu de données existent actuellement sur les propriétés électrophysiologiques des PO NG2+ et l'influence de l'activité sur ces cellules au cours du développement.

Dans la moelle épinière (ME) de souris, il est possible d'observer des PO NG2+ dans la corne ventrale de la ME dès E12.5, ce qui correspond à la région et à la période où les premières synapses se mettent en place. Il est important de noter que la capacité des PO NG2+ de la ME à recevoir des synapses n'a pas encore été établie et que leur dynamique précoce est encore mal comprise. De manière générale, les PO NG2+ ont été presque exclusivement étudié dans le contexte de la myélinisation qui démarre après la naissance. Notre projet vise donc à déterminer :

1. Les propriétés électrophysiologiques précoces des PO NG2+ et si elles reçoivent des synapses au moment de la mise en place des réseaux synaptiques de la moelle épinière à partir de E12 chez la souris. Techniques : Enregistrements électrophysiologiques sur moelle isolée, immunohistochimie, microscopie électronique.

2. Quelle est l'influence de ces synapses et de l'activité neuronale précoce sur la spécification, la prolifération, la migration et le positionnement des PO NG2+. Techniques : Culture ex vivo de moelle épinière, blocage pharmacologique de l'activité, marquage immunohistochimique.

3. Quelle est l'influence de l'activité sur la dynamique calcique des PO NG2+, le calcium étant un des voies de signalisation majeure influencé par l'activité neuronale au cours du développement. Techniques : Imagerie calcique sur moelle isolée

Ce projet pilote sera réalisé chez la souris et nécessitera l'utilisation d'environ 80 femelles gestantes de la lignée transgénique CNP-EGFP. Dans la mesure où la formation et le fonctionnement de ces réseaux ne peut être observée que dans le cadre d'un organisme vivant, cette étude nécessite l'utilisation de souris transgéniques et ne peut être remplacé par une autre approche. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit autant que possible tout en préservant la pertinence scientifique du projet. Enfin, le projet n'implique aucune manipulation susceptible d'induire une douleur sur l'animal vivant, tous les animaux étant sacrifiés avant manipulation expérimentale.

3485. Les molécules thérapeutiques utilisées en neurologie ou en psychiatrie sont généralement créées par chimie médicinale en visant à bloquer une cible thérapeutique spécifique (récepteur ou enzyme) présent dans des neurones. L'effet de la molécule est ensuite validé par des méthodes biochimiques et sur des cultures cellulaires. Enfin, la molécule est testée in vivo, par l'analyse du comportement d'un modèle animal de la pathologie. Cette dernière étape nécessite l'utilisation de nombres relativement élevés d'animaux, et s'avère peu prédictive quant à l'efficacité thérapeutique chez l'homme, en particulier en psychiatrie. Par ailleurs, l'ensemble de cette démarche apporte très peu d'information sur le mécanisme d'action précis de la molécule sur les cellules d'intérêt (les neurones) dans leur contexte physiologique, et ce manque de compréhension du niveau cellulaire contribue à expliquer pourquoi aussi peu de nouvelles molécules ont été mises sur le marché ces dernières décennies en neurologie et psychiatrie.

L'imagerie de biosenseurs permet d'enregistrer en temps réel par microscopie optique des signaux biologiques spécifiques au sein de cellules vivantes. Un biosenseur est une protéine (codée par un gène) qu'on fait exprimer dans les cellules d'intérêt et qui indique, par des changements de fluorescence, l'état d'un processus clé dans la cellule vivante. Chacun de ces rapporteurs optiques permet ainsi de mesurer en temps réel l'évolution d'une cascade de signalisation intracellulaire, l'activation de facteurs de transcription, l'activité métabolique... Cette approche d'imagerie, d'une grande résolution temporelle et spatiale, apporte en un unique enregistrement sur des neurones individuels, identifiés par leur localisation dans le cerveau, leur morphologie ou d'autres signes fonctionnels, une description quantitative de la dynamique de ces événements cellulaires et de leur perturbation par une molécule à visée thérapeutique. L'obtention de ces données par des méthodes biochimiques classiques nécessiterait bien plus d'expériences et le sacrifice de nombreux animaux, et in fine, s'avère moins précise que l'imagerie cellulaire.

La souris représente un modèle animal couramment utilisé dans les études en neurosciences fondamentales et pré-cliniques, car facile à élever, à modifier génétiquement, et il est raisonnable de penser que les mécanismes cellulaires fondamentaux mis

en jeu dans le cerveau sont similaires chez la souris et chez l'homme. Jusqu'à présent, nous avons travaillé sur des préparations ex vivo de jeunes souris. Nous souhaitons utiliser également l'animal adulte, pour suivre l'évolution de l'action de molécules thérapeutiques à divers âges de l'animal. Notre approche expérimentale actuelle n'est applicable que chez le jeune, et c'est pourquoi nous souhaitons mettre en place un nouveau protocole. Ce protocole repose sur l'injection du vecteur viral in vivo dans la région d'intérêt du cerveau, et après 1 jour d'expression, prélever le cerveau et pratiquer l'imagerie immédiatement sur les tranches de cerveau.

Ce projet permettra une nouvelle approche d'analyse de la dynamique de la signalisation intracellulaire dans des neurones vivants de souris, pour tout âge et condition. Cette approche apportera, avec relativement peu d'animaux, des données dynamiques qui donneront une compréhension mécanistique de l'effet de molécules thérapeutiques sur les neurones. Ce projet vise à mettre en place ces nouvelles conditions expérimentales et nécessite 80 animaux.

3486. La prise en charge thérapeutique des douleurs neuropathiques, provenant d'une lésion du système nerveux central ou périphérique, est actuellement insatisfaisante en termes d'efficacité. Les traitements les plus prescrits, antiépileptiques et antidépresseurs, ne proposent qu'une faible réduction de la douleur chez le patient et l'augmentation de leurs doses est confrontée à la présence d'effets indésirables. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent ce processus pathologique. Les astrocytes, cellules gliales majoritaires chez les mammifères, ont un rôle fondamental dans la mise en place du mécanisme d'inflammation impliqué dans les douleurs neuropathiques. Plus récemment, les connexines astrocytaires, protéines membranaires engagées dans la communication cellulaire, ont également été impliquées dans l'induction de cette pathologie. L'inhibition de la connexine astrocytaire 43 s'est d'ailleurs révélée être anti-nociceptive. Le but de ce projet est de caractériser la contribution des connexines aux douleurs neuropathiques induites expérimentalement chez la souris et d'étudier la potentialisation d'antidépresseurs et d'antiépileptiques par des inhibiteurs de connexines dans un modèle murin de douleur neuropathique ainsi que les mécanismes mis en jeux aux niveaux cellulaires et moléculaires

Afin de réaliser cette étude, il est nécessaire de s'appuyer sur des modèles animaux, les modèles in vitro ne permettant pas le développement de douleurs neuropathiques. Pour ce projet, des souris seront dans un premier temps lésées au niveau du nerf sciatique, afin d'induire une douleur neuropathique périphérique. La chirurgie sera effectuée sous anesthésie générale et une incision de taille minimale sera pratiquée. Pour réduire la douleur post-chirurgicale, un antalgique sera administré après l'intervention et au cours des 2 jours qui la suivent. Des souris contrôles, non lésées, seront également utilisées. Les conséquences de ce processus pathologique sur l'expression et la fonction des connexines astrocytaires seront analysées. L'étude de souris KO pour les connexines astrocytaires sera réalisée afin d'étudier la conséquence de cette inhibition des connexines dans le développement de la pathologie. En parallèle, des études pharmacologiques impliquant l'administration, par voie intra-péritonéale ou via des pompes sous cutanées, d'antidépresseurs et antiépileptiques seuls ou combinés avec des inhibiteurs de connexines, seront réalisées afin d'identifier la combinaison la plus efficace pour lutter contre la douleur neuropathique. Pour l'ensemble des expériences réalisées, 8 souris par condition seront nécessaires pour réaliser des tests statistiques, environ 600 souris seront utilisées pour la réalisation de l'ensemble du projet. A l'issue de ces expériences, les animaux seront euthanasiés selon la méthode recommandée par les comités d'éthique en expérimentation animale, i.e. pour les souris la dislocation cervicale, puis leurs cerveaux, ganglions et moelles seront prélevés pour réaliser des études par Western Blot, immunofluorescence, ou RT-PCR.

3487. L'addiction implique une plasticité synaptique au niveau des circuits neuronaux de la récompense dont le striatum est une structure essentielle. L'intégration des signaux dopaminergiques (relatifs à la récompense) et glutamatergiques (liés au contexte et à l'environnement) par les neurones épineux moyens du striatum est en effet critique pour les modifications comportementales à long terme induites par les substances addictives. Les études d'imagerie chez l'homme et l'analyse comportementale chez le rongeur démontrent l'importance de la connectivité cortico-striatale dans les comportements addictifs, pour lesquels aucun traitement pharmacologique n'existe.

Notre projet vise à caractériser la dynamique des modifications moléculaires et morphologiques induites par la cocaïne à la synapse cortico-striatale chez des souris sauvages ou génétiquement modifiées et à établir leur(s) rôle(s) dans les réponses comportementales induites par cette substance addictive. Nos collaborateurs nous permettront de tester la pertinence de nos résultats sur des cohortes de sujets sains et de patients dépendants à la cocaïne.

Notre objectif est donc de progresser dans la compréhension des bases moléculaires de l'addiction. Il présente un fort potentiel dans l'identification de bio-marqueurs, de nouvelles cibles pharmacologiques et de facteurs de risque dans le but ultime de développer des approches thérapeutiques chez les patients dépendants à la cocaïne.

L'ensemble du projet sera réalisé en utilisant la souris *Mus musculus* comme modèle animal. Nous estimons que 750 animaux sont nécessaires. Le choix du modèle murin s'impose de par la fait que les processus étudiés sont spécifiques du réseau neuronal et ne se retrouvent pas dans des modèles de lignées cellulaires. Afin de réduire les nombres d'animaux, nous testons nos hypothèses de travail sur des cultures de neurones et des tranches de cerveaux ; en effet, le sacrifice d'un nombre réduit d'animaux, sans souffrance, permet de réaliser un plus grand nombre d'expériences que lorsque les expériences sont réalisées in vivo. Afin de raffiner, nous établissons chaque plan d'expérience avec l'idée de minimiser le nombre d'animaux. Comme justifié plus haut, nous ne pouvons pas remplacer car l'objet de l'étude est spécifique au modèle animal.

3488. La physiologie osseuse repose sur un équilibre entre la formation d'une matrice osseuse (apposition) et la dégradation de cette même matrice (résorption). Les cellules impliquées dans cet équilibre appelé remodelage osseux sont les ostéoblastes

(apposition) et les ostéoclastes (résorption). Ce remodelage osseux permet, entre-autre fonction, la croissance des os longs pendant l'enfance et l'adolescence.

Des données récentes suggèrent que les inhibiteurs de voies de signalisation ont un réel intérêt en cancérologie dans le développement de thérapies ciblées. Au laboratoire INSERM UMR957, nous nous intéressons aux tumeurs osseuses primitives malignes, principalement l'ostéosarcome. Cependant, ce cancer touchant préférentiellement les enfants, les adolescents et les jeunes adultes, il paraît indispensable de savoir par des expérimentations précliniques dans des modèles d'ostéosarcome si les inhibiteurs utilisés en cliniques peuvent altérer l'évolution normale du développement et de la croissance osseuse.

Le projet portera donc sur l'étude des effets d'inhibiteurs de voies de signalisation sur la croissance de souriceaux. Les molécules testées seront :

- L'Imatinib Mésylate, inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et dans le traitement des GIST (GastroIntestinal Stromal Tumor),
- NVP-BEZ235-AN, inhibiteur des protéines mTor et PI3K,
- BYL719, inhibiteur spécifique de la sous unité PI3K $\alpha$ .

Ces inhibiteurs seront testés en « monothérapie » chez des souriceaux de souche C57Bl/6J ou C3H/HeN âgés de 11 à 35 jours (équivalent à une thérapie chez un enfant âgé de 6/7 ans jusqu'à ces 15/16 ans).

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro sur des cellules impliquées dans la physiologie osseuse (ostéoblastes/ostéoclastes) et l'éventuel impact des molécules chez un organisme vivant : le souriceau. Il n'est pas possible de remplacer ces analyses par des tests in vivo. Le nombre de souriceaux utilisés sera réduit au maximum mais permettra de pouvoir conclure de façon significative sur les effets observés, un nombre maximal total de 288 souriceaux pourra être utilisé. Enfin, les animaux seront hébergés dans des conditions de raffinement en appliquant les procédures relatives au bien être animal, avec de l'enrichissement dans les cages et un suivi quotidien du comportement animal.

3489. Les maladies génétiques, qui affectent l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), entraînent des pertes sévères et rapides de la vision conduisant jusqu'à la cécité et affectent des millions de personnes dans le monde. Alors que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), qui représente la forme la plus commune de cécité dans les pays occidentaux, semble déclenchée par des causes environnementales et génétiques, les rétinites pigmentaires (RP) sont d'origine monogénique et affectent des populations plus jeunes. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA et 200000 de RP. La perte des photorécepteurs est due au mauvais fonctionnement ou à la dégénérescence de cet EPR. Jusqu'à présent aucun traitement n'est disponible pour ces pathologies. La thérapie génique, qui peut rétablir certaines fonctions des cellules EPR, est cependant rendue difficile par l'hétérogénéité des mutations causales.

Le protocole est proposé dans le cadre de l'évaluation du bénéfice fonctionnel et de la sécurité d'un produit de thérapie cellulaire (PTC). Ce PTC est composé de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dérivées de cellules souches embryonnaires humaines, et d'une membrane amniotique humaine servant de support. Ce PTC sera greffé dans l'espace sous-rétinien d'un modèle de rat présentant une dégénérescence rétinienne (rats RCS). Le bénéfice fonctionnel du PTC sera alors évalué par différents tests (électrorétinogramme, OCT et optomoteur) et comparé à l'injection de cellules EPR (issues des cellules souches embryonnaires humaines) en suspension ou d'une membrane amniotique seule.

De même, après greffe du PTC ou des cellules de l'EPR injectées en suspension dans l'espace sous-rétinien, l'innocuité du produit sera évaluée sur des rats immuno-déficients (rats Nude). Les critères de sécurité évalués pour cette demande d'autorisation concernent la biodistribution des cellules du PTC (absence des cellules hors de l'œil). Cette étude préclinique sur modèles animaux de la pathologie ainsi que l'utilisation d'animaux immunodéprimés supplémentaires pour les essais de sécurité, sont requis pour une demande d'essai clinique chez l'homme.

Au total, 150 animaux sont prévus pour cette étude :

120 rats RCS, qui développent une dégénération de la rétine, seront utilisés pour l'évaluation de l'efficacité du PTC au cours du temps. Dix rats de la même lignée mais non porteur de la mutation serviront de contrôles.

De plus, 20 rats immuno-déficients (Nude) seront utilisés dans l'évaluation de l'innocuité des cellules du PTC.

L'utilisation de l'imagerie rétinienne (tomographie par cohérence optique) et les approches d'analyses de la fonction rétinienne in vivo (optocinétique et électrorétinogramme) permettront de suivre l'évolution par différentes mesures répétées de la dégénérescence rétinienne au cours du temps sur un même groupe d'animaux (réduisant ainsi le nombre total d'animaux). De même, chaque animal n'est greffé que sur un œil, l'autre servant de contrôle, ce qui réduit d'autant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

3490. Les neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (VTA) jouent un rôle majeur dans les comportements orientés vers une récompense. Les drogues les détournent de leur fonction endogène et aboutissent à la prise compulsive de celles-ci. Les neurones DA sont régulés par des récepteurs nicotiques (nAChR), qui sont largement exprimés dans le cerveau. Leurs diverses sous-unités aux propriétés différentes influencent la libération de neurotransmetteurs, l'excitabilité et la plasticité du cerveau. Les neurones DA sont impliqués dans des maladies mentales (Parkinson, Huntington, Alzheimer) pour lesquelles la recherche pharmaceutique travaille sur des traitements visant les nAChR. Les expériences que nous menons ont pour objectif de disséquer le rôle des différentes sous-unités des nAChRs sur l'activité des neurones dopaminergiques, à la fois dans les processus de contrôle endogènes et dans ceux exercés par les drogues. Nous utiliserons des outils optogénétiques nouveaux qui permettent de contrôler avec la lumière l'activité des neurones, mais aussi des récepteurs nicotiques endogènes. Pour cela nous utiliserons des souris C57B/6 de type sauvage (WT) et des souris délétées pour certaines sous-

unités des nAChRs (α7-/- et α2-/-). Nous utiliserons également des lignées GAD67-Cre et DAT-Cre afin de restreindre l'expression des outils optogénétiques aux neurones GABAergiques et dopaminergiques de la VTA. Pour l'ensemble des conditions, nous estimons que nous utiliserons 265 animaux pour ce projet qui s'étend sur 5 ans. Le choix des animaux se justifie par la présence d'un réseau dopaminergique et cholinergique très similaire à celui de l'Homme, ce qui n'est pas le cas chez les invertébrés, les poissons ou les oiseaux. Enfin, la génétique de la souris offre des outils de modulation du réseau neuronal, ce qui est difficilement accessible chez d'autres animaux. De manière à restreindre le nombre d'animaux, les analyses et études statistiques seront effectuées quotidiennement, permettant de ne pas utiliser inutilement des animaux. L'ensemble de ces propositions vise à respecter le principe des 3Rs.

3491. De manière générale, les tumeurs osseuses sont des pathologies très douloureuses et difficiles à prendre en charge avec les thérapeutiques actuelles. Ces tumeurs peuvent être divisées en 2 groupes.

Les tumeurs osseuses primitives sont des tumeurs qui ont pour origine le tissu osseux et il en existe 3 principaux types que sont l'ostéosarcome, le chondrosarcome et le sarcome d'Ewing. Parmi celles-ci, les plus fréquentes sont les ostéosarcomes qui sont des tumeurs malignes très agressives survenant généralement dans une population jeune et classées parmi les pathologies rares. Avec les thérapeutiques actuelles, la survie des patients à 5 ans est de 60-70% mais chute à 30% lorsque des métastases pulmonaires sont détectées.

Les tumeurs osseuses secondaires sont des tumeurs qui ont pour origine des cellules tumorales d'un autre organe (principalement sein et prostate) qui migrent et métastasent au niveau des os. Les cancers du sein représentent les tumeurs malignes les plus fréquentes chez la femme et les métastases osseuses qui en dérivent sont détectées dans 80% des cas de cancer avancé. Ces métastases osseuses de carcinome mammaire sont majoritairement ostéolytiques et peuvent à terme augmenter les taux de morbidité et mortalité chez les patients.

Face à ces taux de survie assez médiocres, le développement de nouvelles thérapies pour ces tumeurs osseuses primitives ou secondaires apparaît nécessaire. Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles possédant une partie HBP (hydroxybisphosphonate) et une partie anticancéreuse. De par la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, ces molécules permettraient de vectoriser des anticancéreux afin d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (et ainsi de traiter plus efficacement la tumeur) en diminuant les concentrations circulantes (responsables des effets secondaires des anticancéreux). L'activité anti-résorption osseuse de l'HBP pourrait également participer à l'effet antitumoral (en plus de celui exercé par l'anticancéreux) en bloquant le cercle vicieux entre ostéolyse et prolifération tumorale. En effet, le développement tumoral induit une destruction du tissu osseux. Lors de cette ostéolyse, différents facteurs sont libérés, qui pourront à leur tour favoriser la croissance des cellules tumorales.

Ce projet consiste à évaluer l'efficacité de molécules bifonctionnelles administrées chez des rongeurs développant une tumeur osseuse et pourra inclure un total de 80 rats et 1800 souris. Les molécules synthétisées sont dans un premier temps testées in vitro, du point de vue de leur cytotoxicité sur des lignées tumorales et de leur capacité de ciblage osseux. Les molécules intéressantes devront ensuite être étudiées chez l'animal afin d'évaluer leur impact dans un environnement tumoral complexe associant la prolifération tumorale et le remodelage osseux. Aucune méthode alternative ne permet de reproduire ce microenvironnement. De plus, l'effet de nos molécules sera dépendant de leur biodisponibilité et de leur facilité de clivage in vivo. L'objectif de ces études précliniques est de sélectionner les 2 ou 3 candidats les plus actifs démontrant une efficacité anti-tumorale supérieure aux thérapeutiques actuelles tout en diminuant la toxicité. Ce projet est divisé en 3 étapes :

Procédure expérimentale n°1 : Les molécules retenues pour les tests in-vivo seront tout d'abord administrées à des souris saines à différentes concentrations dans le but de déterminer la dose maximale tolérable et de choisir la dose qui sera ensuite utilisée lors des tests d'activité anti-tumorale.

Procédure expérimentale n°2 : Différents modèles tumoraux devront être mis au point et validés. Ceux-ci pourront être induits par injection para-tibiale ou intra-tibiale de lignées tumorales ou injection intracardiaque de lignées tumorales ayant un tropisme pour le tissu osseux.

Procédure expérimentale n°3 : Les molécules seront alors évaluées sur leurs propriétés anti-tumorales dans un modèle d'ostéosarcome précédemment validé. Les critères d'efficacité incluent le versant anti-tumoral, anti-résorptif et anti-métastatique des molécules bifonctionnelles. Les protocoles incluront 10 animaux par groupe (10 souris non traitées, 10 souris traitées avec le traitement de référence et 10 souris traitées avec la molécule bifonctionnelle). Par soucis de respect de la règle des 3R, les tests pour plusieurs molécules seront regroupés afin de limiter le nombre d'animaux en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. D'autre part, le minimum de molécules possible seront évaluées in-vivo et ce en ciblant les synthèses chimiques en fonction des premiers résultats et en sélectionnant le plus possible les molécules par les tests de cytotoxicité in-vitro. Le respect du bien-être animal passera par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi quotidien des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées (traitement antalgique ou euthanasie par des méthodes reconnues). Pour les molécules présentant un effet anti-tumoral dans ce premier modèle, un test d'efficacité sera conduit dans plusieurs autres modèles.

A terme, si le développement se poursuit dans de bonnes conditions, ces candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH, afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre des essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints d'ostéosarcome et autres tumeurs osseuses.

3492. La transplantation fait actuellement face à différents problèmes:

- manque d'organes avec des listes croissantes de patients en attente de greffe dont certains meurent avant de se voir proposer un organe.

- rejet à plus ou moins long terme du greffon constitue également un problème. Différents modèles de recherche chez le primate peuvent mimer parfaitement des situations cliniques connues et permettent ainsi de tester différents protocoles thérapeutiques innovants en conditions pré-cliniques.

Ainsi dans ce protocole expérimental, nous proposons de tester différentes associations thérapeutiques innovantes, jamais utilisées chez l'homme jusqu'à présent, dans un modèle de rejet médié par anticorps. Il s'agit d'une situation très critique en transplantation humaine, en particulier chez des patients alloimmunisés et vis-à-vis de laquelle les immunosuppressions actuelles ne sont que partiellement efficaces.

Il s'agit ici d'appliquer un double blocage de la réponse humorale :

1- Blocage de la réponse anticorps :

- blocage de la costimulation nécessaire à l'activation des cellules productrices d'anticorps

- blocage des cellules productrices d'anticorps (B et plasmocytes)

2- Blocage de l'activation du complément secondaire à la fixation des anticorps dans le greffon.

Le nombre maximal d'animaux sera de 45 (donneurs et receveurs d'organes compris) nous soulignons ici que dans un souci de réduction maximale du nombre d'animaux utilisés nous commencerons l'étude par le groupe 1 tri-thérapie. La réalisation des groupes "contrôles" bi et monothérapie ne dépendra que des résultats obtenus dans le groupe d'intérêt : si les résultats montrent une prolongation significative de la survie du greffon par rapport au groupe de babouins immunisés mono-thérapie, alors les autres groupes seront réalisés, afin d'en comprendre les mécanismes. Si les résultats ne montrent pas de prolongation significative de survie du greffon, les autres groupes ne seront pas réalisés. D'autre part nous rappelons que notre protocole de transplantation compte un donneur pour 2 receveurs d'organe.

3493. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui touche 1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme. Elle atteint les articulations et les os péri-articulaires. Elle se traduit par une inflammation chronique dans le compartiment synovial et des érosions de l'os, avec gonflement et perte de fonction articulaire. Plusieurs articulations sont touchées à la fois, et de manière symétrique. Elle affecte fortement le mode de vie du patient.

Dans cette maladie, nous ne comprenons pas encore l'établissement d'une perte osseuse associée aux problèmes articulaires. De plus cette fragilité osseuse est hétérogène chez l'humain. Une meilleure compréhension des mécanismes nécessite le recours à un modèle animal capable de développer la maladie de manière reproductible et uniforme.

Le rat est le modèle animal choisi ici. En effet, il partage avec l'homme les mêmes acteurs et voies de signalisations de l'inflammation, et aussi du remodelage osseux.

Ce modèle n'est pas remplaçable par des modèles in vitro qui ne permettent pas l'observation de la perte osseuse associée la maladie articulaire.

Nous souhaitons donc utiliser un modèle d'arthrite expérimentale induite par adjuvant (AIA dans la littérature) chez le rat pour étudier la perte osseuse. Ce modèle est le plus reproductible, et c'est celui qui permet de réduire le plus le nombre d'animaux nécessaires, c'est pourquoi nous l'avons sélectionné (comparé par exemple au modèle d'arthrite induite au collagène). De plus, avec ce modèle la durée de l'arthrite sera beaucoup plus courte.

Nous avons ainsi pu réduire le protocole à n=5 animaux (qui reste le minimum pour l'exploitation statistique qui validera l'expérience) dans 7 groupes, pour seulement 24 jours de protocole, soit un total de 35 animaux.

La peur et la douleur seront limitées au maximum sachant que nous devons laisser l'inflammation se développer. Des points limites ont clairement été mis en place (perte de poids rapide, qui dépasse 15% du poids initial, automutilation, arrêt de prise d'eau/de nourriture) dans le but d'identifier rapidement le mal-être d'un animal et d'abrèger le protocole pour celui-ci. Toute mise à mort sera réalisée en surdose d'anesthésique, ainsi que le recommande le décret 2013-118 du 01/02/2013.

3494. Le diagnostic de maladies infectieuses repose sur différents critères : signes cliniques, radiologiques, facteurs de risque associés... et sur les résultats de tests biologiques. L'utilité des tests biologiques est d'autant plus grande que certaines infections présentent peu ou pas de signes cliniques caractéristiques. Un large panel de tests biologiques existe de la culture de prélèvements à la recherche d'anticorps spécifiques dans le sang des patients. Cette recherche d'anticorps spécifiques est dans de nombreuses maladies infectieuses le seul moyen de diagnostiquer et secondairement traiter certaines maladies.

C'est dans le but de développer et commercialiser des tests diagnostiques de maladies pour l'Homme et/ou les animaux, que notre laboratoire Hospitalo-Universitaire collabore avec une entreprise. Nous souhaitons mettre au point des tests fiables, spécifiques et sensibles de recherche d'anticorps de pathogènes parasitaires comme *Toxoplasma gondii* responsables de maladies graves et parfois mortelles chez l'homme. L'utilisation d'antigènes est la clé de voute de la mise au point de test de recherche d'anticorps. En l'absence d'alternative de bonne qualité, l'obtention de tels antigènes passe par l'expérimentation d'animaux. Suite à l'injection d'agents infectieux, l'animal va développer et produire une ascite en 3 à 7 jours. Ces ascites (constituées exclusivement de *Toxoplasma gondii*), après purification, permettront de développer des tests sérologiques permettant, chez l'homme de faire le diagnostic de patient infecté.

Nos différentes expérimentations suivront le même schéma expérimental. Des souris, 20 à 100 par lot en fonction des besoins de production de tests diagnostiques, seront infectées par voie péritonéale (souche RH de développement rapide). Un maximum de 15 lots (900 souris) sera utilisé dans ce protocole. Pour le redémarrage de la souche in vivo (mois avant production) un maximum de 300 animaux supplémentaires sera utilisé (soit un total maximum de 1200 souris sur 5 ans).

Au 3ème jour, les souris infectées ne développeront aucun signe clinique d'évolution de la maladie à part le développement d'une ascite de volume croissant. L'animal sera mis à mort, les parasites seront récupérés, lavés et purifiés et serviront à la production d'antigène pour le développement de test sérologique. La seule manipulation réalisée sur l'animal vivant correspondra à l'inoculation inaugurale par voie intrapéritonéale. Cette inoculation sera faite afin d'éviter au maximum le stress et la douleur des animaux. Si, malgré ces précautions, l'animal présente avant sa mise à mort programmée (J3) une complication infectieuse inattendue (Points limites : croissance trop rapide de l'ascite, animal cachectique), l'animal sera mis à mort prématurément (à J2,5) afin de lui éviter toute souffrance inutile.

Notre objectif, dans un premier temps, est de répondre à une forte demande des médecins spécialistes d'avoir des tests fiables permettant le diagnostic de toxoplasmose congénitale et de toxoplasmose de l'immunodéprimé. Ces deux pathologies sont potentiellement graves puisque, chez l'homme, des malformations congénitales et le décès de patients immunodéprimés sont rares mais possible.

3495. A l'heure actuelle, compte tenu de la prévalence et de l'incidence de l'obésité et de son cortège de désordres physiopathologiques associés, il est important de rechercher de nouvelles substances capables de contrôler et de limiter la prise de poids et/ou la survenue des désordres associés. Parmi ces substances, la littérature accumulée ces dernières années sur les propriétés des polyphénols et caroténoïdes laisse penser que ces substances pourraient présenter des effets d'intérêt vis-à-vis de l'obésité induite par l'alimentation ainsi que l'inflammation à bas bruit associée à l'obésité et l'insulino-résistance. L'objectif principal de ce projet est donc d'évaluer l'impact d'une supplémentation en différents types d'extraits végétaux seuls ou en combinaison sur la prise de poids et la sensibilité à l'insuline de souris (110 au total) dans un modèle validé d'obésité induite par l'alimentation. Les objectifs secondaires seront d'explorer l'impact de ces supplémentations sur les mécanismes moléculaires impliqués sur les désordres physiopathologiques au premier plan desquels l'inflammation à bas bruit et l'insulino-résistance associés à l'obésité. Le principe des 3Rs qui consiste à réduire, raffiner et remplacer l'expérimentation animale sera respecté.

3496. Chez l'homme, la possibilité de contrôler les deux mains de façon indépendante est cruciale pour les activités de la vie quotidienne et implique une latéralisation du contrôle moteur. La réalisation de mouvements indépendants et coordonnés des deux mains implique une communication appropriée entre les deux hémisphères cérébraux, principalement grâce aux voies trans-calleuses. Le cortex moteur primaire transmet la commande motrice appropriée à la main controlatérale au travers d'un faisceau cortico-spinal croisé. Les mouvements en miroir (MM) sont des mouvements involontaires survenant d'un côté du corps, accompagnant de façon symétrique et simultanée les mouvements volontaires controlatéraux. Les sujets atteints de MM congénitaux sont incapables d'effectuer un mouvement manuel unilatéral strict. Toute activité bi-manuelle élaborée nécessitant une dissociation des mouvements des deux mains est impossible. L'utilisation plus ou moins prolongée des mains est à l'origine de douleurs et de contractures, en particulier du côté non-dominant. Il n'y a à ce jour pas de traitement efficace. Les bases moléculaires qui permettent la mise en place d'un contrôle moteur latéralisé au cours du développement sont mal connues.

Notre projet propose de disséquer ces bases moléculaires en nous appuyant sur 13 modèles de souris transgéniques déficitaires pour des gènes impliqués dans le guidage des axones corticospinaux afin i) de caractériser un phénotype « MM » chez la souris par des tests comportementaux, ii) de clarifier les mécanismes développementaux qui aboutissent à l'existence d'un contingent anormal de fibres corticospinales ipsilatérales.

Une série de tests comportementaux sera effectué sur chaque lignée de souris (20 souris transgéniques et 20 souris contrôles) par lignée. Comme test comportemental, nous utiliserons notamment le test de Capellini qui utilise le fait que les rongeurs ont des mouvements stéréotypés pour manger qui mettent en jeu les deux pattes. Ce test est donc particulièrement bien adapté pour étudier les mouvements « bi-pattuels ». Un total de 520 souris sera évalué en comportement. Seuls 10 animaux par lignées (5 transgéniques et 5 contrôles) et uniquement pour les lignées présentant des déficits comportementaux seront soumis à une chirurgie pour visualiser le faisceau corticospinal et révéler la présence éventuelle d'un contingent de fibres non croisées. Ainsi le nombre d'animaux soumis à une chirurgie sera restreint dans un souci de réduire le nombre d'expérience. Le nombre de souris utilisé dans ce projet sera de 520.

Pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum sauf cas exceptionnel. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, ou de retirer les animaux morts des salles d'hébergement. Ces contrôles seront enregistrés. Des méthodes seront mises en place pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux (injection d'antalgiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique).

Ce travail permettra de déterminer certaines bases moléculaires du contrôle moteur latéralisé et de définir le rôle du faisceau cortico-spinal dans ce processus

3497. La myéline est un élément essentiel de la conduction nerveuse et sa destruction aboutit à long terme à des troubles neurologiques graves chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP). Une des caractéristiques intéressantes de la SEP est que parallèlement au développement de la maladie un processus de réparation endogène, nommé la remyélinisation, s'enclenche. Dans le système nerveux central (SNC), la réparation de la myéline est menée par les oligodendrocytes, cellules myélinisantes du SNC mais aussi par les cellules myélinisantes du SNP, les cellules de Schwann (CS). La réparation due aux CS permet d'inverser des déficits neurologiques dans un modèle de démyélinisation massive de la moelle épinière. En plus de

leur capacité à remyéliniser les axones, les CS produisent des facteurs trophiques qui favorisent la survie et la régénération axonale. Finalement, les CS sont plus résistantes que les oligodendrocytes qui demeurent une des cibles principales des attaques inflammatoires qui se succèdent chez les patients atteints de SEP. Favoriser leur intervention au sein du SNC démyélinisé est donc une stratégie d'intérêt pour les patients atteints de cette pathologie.

Lors de l'élaboration du protocole expérimental, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi un modèle de remyélinisation murin dont la chronologie du processus de réparation est bien définie. Ainsi nous avons pu réduire les groupes expérimentaux à quelques temps après la lésion pour évaluer l'origine des cellules du SNP qui envahissaient le SNC.

Nous suivrons les cellules du SNP grâce à une lignée de souris transgénique Krox 20 Cre-/+ : ROSA 26 YFP ou tomato qui permet le traçage des cellules dérivées des capsules frontales ou CF (principales sources des cellules du SNP).

Suite à une lésion de démyélinisation du SNC, nous étudierons le devenir des cellules dérivées des CF en sacrifiant les souris à différents temps après la lésion.

Krox 20 Cre-/+ : ROSA 26 YFP

6 lots expérimentaux avec 5 animaux par lot et 3 expériences indépendantes : 90 animaux total

Krox 20 Cre-/+ : ROSA 26 tomato

6 lots expérimentaux avec 5 animaux par lot et 3 expériences indépendantes: 90 animaux total

Nous évaluerons l'effet de la lésion sur la capacité des cellules du SNP à faire des neurosphères et leurs multipotentialités à 4 temps de sacrifice après la lésion 0, 2, 4, 7 jours.

Krox 20 Cre-/+ : ROSA 26 YFP

4 lots expérimentaux avec 6 animaux par lot et 3 expériences indépendantes : 72 animaux total

Krox 20 Cre-/+ : ROSA 26 tomato

4 lots expérimentaux avec 6 animaux par lot et 3 expériences indépendantes: 72 animaux total

Les animaux seront observés tous les jours pendant la première semaine après la chirurgie et si aucun signe suspect n'est observé la fréquence sera de 2 fois par semaine jusqu'au sacrifice.

Suite à la chirurgie et pendant 4 jours, selon les recommandations du vétérinaire, on administrera un antalgique en sous cutané (buprénorphine (0.05-0.1 mg/kg).

En cas de signe manifeste de douleur ou de souffrance avérée au-delà de ces 4 jours telle que : la prostration, l'isolement, la perte de poids supérieure à 10% en 24h (prise de poids de référence le jour de la chirurgie puis suivi tous les jours pendant la première semaine puis 2 fois par semaine avant le sacrifice), le poil hérissé ou le chanfrein convexe, nous avons prévu une administration de Buprenorphine (0.05 à 0,1mg/kg SC). Si les points de critères absolus (voir ci-dessous) sont observés chez des animaux, ils seront immédiatement euthanasiés.

3498. La myéline est un élément essentiel de la conduction nerveuse et sa destruction aboutit à long terme à des troubles neurologiques graves chez les patients atteints de la sclérose en plaques (SEP). Une des caractéristiques intéressantes de la SEP est que parallèlement au développement de la maladie un processus de réparation endogène, nommé la remyélinisation, s'enclenche. Alors que l'inflammation est l'une des causes principales de la perte de myéline, la présence des cellules immunitaires et la production de molécules chimio-attractantes est un élément indispensable à la mise en place de la remyélinisation. Nous proposons d'associer plusieurs domaines de recherche : la génétique, l'immunologie et la neurobiologie pour établir de quelle manière le processus immunitaire peut favoriser la remyélinisation endogène. Cette approche innovante et pluridisciplinaire vise à identifier de nouvelles cibles potentielles permettant de moduler l'inflammation de manière à favoriser la réparation ; ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous utiliserons des souris Nude car, de par leur système immunitaire déficient, on ne risque pas de rejet de greffe de cellules humaines.

Lors de l'élaboration du protocole expérimental, afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous avons choisi un modèle de remyélinisation murin dont la chronologie du processus de réparation est bien définie. Ainsi nous avons pu réduire à un temps après la lésion, le temps de sacrifice pour évaluer l'effet des lymphocytes sur la réparation. De plus, nous avons évalué par tests statistiques le nombre minimum d'animaux à greffer pour chaque patients et pour les témoins (10 souris par cas avec 5 souris pour l'étude immunohistochimique et 5 pour la microscopie électronique).

Nous utiliserons donc 500 souris pour cette étude se répartissant de manière suivante :

- Sous-groupe de patients n°1 : 5 patients de ce sous-groupe dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris ainsi il y aura 10 souris par patients : 50 souris.
- Sous-groupe de patients n°2 : 5 patients de ce sous-groupe dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris ainsi il y aura 10 souris par patients : 50 souris.
- Sous-groupe de patients n°3 : 5 patients de ce sous-groupe dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris ainsi il y aura 10 souris par patients : 50 souris.
- Sous-groupe de patients n°4 : 5 patients de ce sous-groupe dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris ainsi il y aura 10 souris par patients : 50 souris.
- Sous-groupe de patients n°5 : 5 patients de ce sous-groupe dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris ainsi il y aura 10 souris par patients : 50 souris.
- Témoin correspondant à des donneurs sains : 25 témoins dont on greffera les lymphocytes dans 10 souris/ témoin ainsi il y aura au total 250 souris.

3499. Au cours de la période périnatale, l'intestin subit une profonde maturation, conduisant à la mise en place de la structure et des fonctions intestinales adultes. Des travaux chez l'animal suggèrent une influence de l'environnement nutritionnel périnatal sur le développement de l'intestin du fœtus et du nouveau-né. Cependant, aucune étude n'a évalué les conséquences à long terme d'un environnement nutritionnel précoce inadapté sur les fonctions intestinales et la survenue de maladies intestinales à l'âge adulte. Les acides gras poly-insaturés de la série n-3 (AGPI n-3) seraient capables de moduler le développement de l'intestin, et participeraient à la réponse intestinale à un stress inflammatoire. Les objectifs de ce travail sont d'étudier : 1) Les effets du retard de croissance post-natal sur la maturation intestinale, et à long terme sur la susceptibilité aux colites inflammatoires chez la souris adulte; 2) L'influence d'une alimentation enrichie en AGPI n-3, notamment en cas de retard de croissance post-natal, sur la maturation intestinale chez la souris au sevrage, et à l'âge adulte sur la réponse intestinale à un stress inflammatoire. Le retard de croissance post-natal sera induit en créant de grandes portées (GP), comprenant 15 souriceaux, par échange des petits entre les mères. Des portées contrôles (PC) fixées à huit petits serviront de référence. Les PC et les GP seront réparties en trois groupes selon le régime alimentaire : i) enrichissement de l'alimentation des mères en AGPI n-3 pendant la lactation; ii) enrichissement de l'alimentation des souriceaux issus des GP et des PC en AGPI n-3 après le sevrage jusqu'à l'âge adulte; iii) alimentation standard pour les mères et pour les souriceaux une fois sevrés. Les animaux seront sacrifiés au sevrage (P21) ou à l'âge adulte (P60) pour étudier l'impact de l'environnement nutritionnel sur la structure et les fonctions intestinales. Quatre PC et quatre GP dans chaque groupe seront nécessaires pour chaque analyse à P21 et à P60 de façon à lisser les variations, liées notamment à l'intensité du retard de croissance et de ses conséquences sur les paramètres de la physiologie intestinale, obtenir des résultats reproductibles, statistiquement exploitables et suffisamment puissants. Ainsi, 651 animaux au total seront nécessaires pour répondre aux objectifs. Il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester l'impact à long terme de l'environnement nutritionnel précoce. Ce travail nécessite donc le recours à un modèle physiologique intégré. Tout animal dont la perte de poids est supérieure à 20 %, ou montrant les signes de souffrance suivant : prostration, poil hérissé, dos voûté, sera immédiatement sacrifié par injection intra-péritonéale de pentobarbital et dislocation cervicale.

3500. Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier l'efficacité de produits vétérinaires chez le chien. Le produit testé peut être un vaccin ou tout autre produit destiné à traiter un chien.

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

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation, un minimum de 5 chiens (ce nombre pouvant aller jusqu'à 30 en fonction des contraintes statistiques) seront traités à la posologie recommandée par le fabricant. Un groupe d'animaux non traité sera inclus pour servir de témoin.

L'efficacité de la vaccination ou du traitement sera évaluée grâce à des prélèvements sanguins, et/ou de salive et/ou la récolte de fèces. La fréquence et le volume des prélèvements sont déterminés en fonction du respect du bien-être et de la santé des animaux, selon recommandations bibliographiques.

L'efficacité du produit pourra également être évaluée par des examens cliniques pouvant inclure des mesures physiologiques non invasives telles que la pression sanguine ou autres.

Pour chaque test, le nombre d'animaux mobilisé sera adapté en fonction des éléments fournis par le laboratoire demandeur, avec pour objectif une réduction maximale de ce nombre. Le design de chaque test et l'hébergement seront optimisés afin de diminuer ou supprimer toute douleur, inconfort ou détresse ressentis par les animaux.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 750 chiens.

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