



**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 (35)

3501. Le programme de notre formation est établi à l'échelle nationale et comprend des enseignements pratiques de physiologie animale, de production animale, de pharmacologie-toxicologie. La manipulation d'animaux de laboratoire y est clairement imposée.

Par ailleurs, durant leur cursus, nos étudiants suivent une formation qui qualifie le personnel appliquant des procédures expérimentales aux animaux (obtention après réussite à des examens théorique et pratique spécifiques).

Durant les séances de Travaux Pratiques suivantes, les étudiants réaliseront des prélèvements de liquides biologiques, administreront par voie veineuse différents médicaments chez l'animal anesthésié. Il est donc important de former ces étudiants aux techniques de cathétérismes, avant d'aborder l'étude de phénomènes physiologiques expérimentaux plus complexes.

Les techniques de cathétérismes (couramment utilisées en Recherche et Développement de l'industrie pharmaceutique et la production animale, domaines principaux d'emplois de nos étudiants) permettent de mettre en évidence l'effet de substances d'origine naturelle ou synthétique à l'échelle de l'organisme entier, ceux-ci n'étant pas visualisables par des méthodes alternatives telles que les méthodes actuelles de biologie cellulaire et moléculaire ou ExAO. Cela permet en outre d'appréhender la variabilité interindividuelle.

Ainsi le nombre d'animaux manipulés sera-t-il de 2170 rats sur cinq ans : 434 rats par an au maximum, à raison d'un rat par étudiant ou d'un rat par binôme en fonction des séances de Travaux Pratiques. Toutefois, l'approche est très progressive : observation de vidéos commentées pas à pas, entraînement sur support non vivant et enfin passage à l'animal. L'observation de vidéos et l'utilisation de rats mannequins réduisent ainsi le nombre d'animaux utilisés. Ce travail s'effectuera sur des rats préalablement analgésiés et anesthésiés qui seront euthanasiés en fin de séance selon la réglementation en vigueur.

3502. Le pronostic du mélanome dépend de l'état d'avancement de la maladie au moment du diagnostic. La présence de métastases ganglionnaires ou à distance est associée à un pronostic beaucoup plus sombre (entre 20 et 70% de survie à 6 à 11 mois en fonction du stade du mélanome) et ce malgré l'usage de la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et de l'immunothérapie. L'objectif de ce projet est donc de développer une thérapie ciblée alternative utilisant des vecteurs non viraux chargés en siRNA administrables par voie intraveineuse. Les siRNA (pour small interfering RNA) sont de petits ARN interférents pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messagers et empêchant ainsi l'expression de gènes en clivant cet ARN. Les vecteurs non-viraux utilisés dans ce but doivent franchir de multiples barrières entre le site d'administration et le site d'action avant de permettre l'action des agents thérapeutiques. De nouveaux vecteurs pour l'administration de siRNA par voie systémique, les nanocapsules lipidiques de siRNA (LNC siRNA) ont été développés au sein de notre unité. Le procédé de formulation des LNC siRNA permet une production aisée de ces nouvelles formulations avec des taux d'encapsulation ainsi que des caractéristiques appropriées pour une administration par voie systémique. Le projet consiste à améliorer le ciblage tumoral après injection systémique des LNC siRNA et proposer une nouvelle approche thérapeutique en ciblant la pompe à sodium dans le traitement du mélanome malin.

Au cours de ce projet, 410 souris NMRI seront utilisées. L'évaluation de l'efficacité de ciblage des LNC ainsi que de l'efficacité des siRNA se fera à l'aide d'un modèle luciférase et par l'utilisation de sondes fluorescentes ce qui permettra ainsi un suivi par imagerie in vivo des animaux en fluorescence et par bioluminescence. Ces techniques non invasives ne nécessitent pas de sacrifice des animaux pour chaque temps d'analyse. Afin de réduire le stress des animaux toutes les séances d'imagerie sont effectuées sous anesthésie gazeuse.

3503. La physiologie de l'organe pancréatique est complexe : il est à la fois siège de production d'hormones et acteur de leur libération dans l'organisme. On sait aussi que dans sa partie endocrine, le pancréas est le siège de différentes cellules dont les cellules  $\beta$  présentes dans les îlots de Langerhans. C'est parce qu'elles sont directement impliquées dans la production d'insuline (et indirectement dans l'apparition des diabètes de types 1 et 2) que ces cellules font l'objet de nombreuses recherches. Mieux comprendre les raisons premières de leur destruction (ou de leurs dysfonctionnements) apparaît donc comme une clef essentielle qui permettra de progresser dans le domaine des thérapeutiques curatives et préventives des

diabète. A ce titre, disposer à volonté en laboratoire de lignées de cellules pancréatiques  $\beta$  humaines est d'un intérêt majeur. Nous avons réussi à générer de telles lignées cellulaires grâce à un protocole expérimental innovant qui a recours à l'oncogenèse ciblée dans le tissu fœtal humain. Dans un premier temps, un vecteur lentiviral (exprimant SV40LT sous le contrôle du promoteur spécifique de l'insuline des cellules  $\beta$ ) est transféré dans un fragment de pancréas fœtal humain. Ce vecteur viral peut s'intégrer «au hasard» dans l'ADN de très nombreuses cellules mais le gène «immortalisant» ne peut s'exprimer que dans les cellules  $\beta$ . Ce transfert de gènes assure donc un avantage sélectif aux cellules  $\beta$  qui vont alors se multiplier sans jamais mourir. Les bourgeons tissulaires pancréatiques ainsi obtenus sont ensuite transplantés dans l'organisme d'une souris immunodéficiente (SCID) permettant la différenciation et l'amplification des cellules  $\beta$  matures. Après plusieurs mois, la tumeur formée est retirée et dissociée. Les cellules générées sont amplifiées en culture et des lignées de cellules  $\beta$  stables peuvent être obtenues. Une de ces lignées cellulaires, EndoC- $\beta$ H1, possède des propriétés moléculaires et fonctionnelles très proches d'une cellule  $\beta$  humaine adulte. En effet, les cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules  $\beta$ , sans aucune expression substantielle de marqueurs d'autres types de cellules du pancréas. Ces cellules représentent un outil unique pour fournir à la fois un modèle d'étude pour la découverte de nouveaux médicaments et une base préclinique pour développer des thérapies innovantes du diabète. Cette technologie pourrait être généralisée à d'autres lignées cellulaires humaines lorsque la cellule de type promoteur spécifique est disponible.

L'obtention de chacune de nos lignées cellulaires endocrines humaines nécessite la greffe au total de 54 souris immunodéficientes SCID. Ce nombre d'animaux est considéré comme étant le minimum nécessaire pour l'obtention d'une lignée cellulaire humaine avec un taux de réussite élevé. Le nombre total de souris nécessaire à l'obtention des sept lignées cellulaires que nous souhaitons générer au cours des cinq années que durera le projet est estimé à 378. La fonctionnalité de chacune des lignées nouvellement créées sera testée in vivo dans un modèle de souris rendue diabétique. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires pour ce test in vivo à 126 souris.

Le nombre total d'animaux utilisés pour l'ensemble du projet proposé s'élève donc à 504 souris.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de substitution (in vitro) pour l'obtention de ces lignées cellulaires. Enfin, les procédures opératoires utilisées dans ce projet ont été élaborées de sorte que la souffrance et le stress de l'animal seront réduits au maximum.

3504. Notre laboratoire développe un nouveau concept de médicaments anticancéreux qui agissent en inhibant les voies de réparation de l'ADN. Ces drogues agissent en synergie avec la radiothérapie et la plupart des chimiothérapies. Elles sont actuellement testées en association avec la radiothérapie dans un essai clinique de phase I/II sur des malades présentant une métastase locale de mélanome cutané. La réussite de cet essai est due à la préparation précise des protocoles de traitement et leur validation dans des essais précliniques sur des tumeurs humaines implantées chez l'animal. L'étude proposée vise à définir les indications qui pourraient bénéficier de ce traitement, préparer des essais cliniques en association à la chimiothérapie en définissant les meilleures combinaisons et les protocoles d'administration. Les modèles tumoraux testés seront les métastases du colon (dans le foie et le péritoine), les tumeurs du foie, les tumeurs du sein et les tumeurs du cerveau, les mélanomes cutanés et de l'œil. Les greffes de tumeurs établies précédemment à partir de tumeurs de patientes sont greffées sur des souris femelles adultes sous anesthésie. Alternativement certaines tumeurs sont issues de la greffe de lignées cellulaires cancéreuses.

Pour l'ensemble des expériences prévues, le nombre de souris utilisées est estimé à 2890 souris pendant 5 ans.

Les molécules testées sont administrées par différentes voies d'administration (intraveineuse, intra-péritonéale, sous-cutanée et intratumorale).

Les traitements associés, tels que les chimiothérapies, sont administrés suivant le protocole le plus en usage (généralement par injection intra-péritonéale).

Dans le cadre d'association de nos molécules avec la radiothérapie, les animaux sont vigiles et placés dans un espace de contention qui leur permet d'avoir une mobilité suffisante de manière à ne pas interférer avec le traitement. Les irradiations sont localisées sur la tumeur à des doses sub-létales.

Croissance tumorale et mesures

La prise tumorale s'effectue en un à plusieurs mois en fonction du modèle. Des mesures régulières permettent l'évaluation de l'efficacité du traitement sur la tumeur (mesure du volume tumoral, pesée) ainsi que d'éventuels effets indésirables dont l'évaluation dépendra de l'état général de l'animal.

Des prélèvements de sang sont effectués en respectant le volume de prélèvement et le temps de régénération du sang chez les animaux. Dans certains cas, les organes et la tumeur sont prélevés après le sacrifice pour des analyses histologiques et moléculaires.

En accord avec les réglementations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal.

3505. Mesurer l'efficacité parasitologique d'un protocole de traitement à l'éprinomectine (voie orale) sur la charge parasitaire (bilans nécropsiques) après infestation expérimentale de chèvres adultes.

Calendrier : février-mars 2014, durée de l'essai = 2 mois, 12 caprins

Matériels et méthodes (simplifié):

1. les animaux : 12 chèvres adultes tarées

2. les infestations parasitaires : chaque animal sera inoculé en une fois, oralement, par 5.000 larves infestantes (L3) d'*Haemonchus contortus* et 10.000 L3 de *Trichostrongylus colubriformis*

3. deux groupes d'animaux seront définis :

a. groupe témoin (n=6) non traité

b. 1 groupe traité (n=6) par un anthelminthique réalisé 25j après l'inoculation

L'ensemble des animaux seront abattus 4 à 5 j après le traitement.

4. après abattage des animaux (euthanasie au T61©), un bilan parasitaire sera réalisé par comptage des parasites adultes dans la caillette et l'intestin grêle selon les procédures en vigueur

Résultats :

La comparaison des charges parasitaires du lot traité avec le lot témoin de référence fournira les données d'efficacité parasitologique pour la molécule testée. Ces données seront confrontées à celles de la littérature disponible pour les autres voies d'administration (pour-on et sous-cutanée).

La confirmation d'une efficacité >95% vis-à-vis de ces deux souches de parasites (caillette et intestin grêle) constituerait une information originale et importante pour l'utilisation de cette molécule par voie orale.

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

Le protocole de confirmation par infestation expérimentale, traitement puis abattage (« controlled efficacy test » des anglo-saxons) est le seul valide pour conclure à l'efficacité d'un antiparasitaire interne (la coproscopie ne reflétant in fine que la ponte des parasites). Il implique, par là même, l'emploi de l'espèce hôte (caprin) comme animal expérimental. Le protocole d'infestation est standardisé et assure une infestation qualifiée de sub-clinique c'est-à-dire sans conséquence visible sur l'état de santé. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (6 animaux par lot).

3506. Ce projet a pour objectif de caractériser le gène déterminant le sexe chez le brochet Européen (*Esox lucius*). Chez cette espèce nous avons récemment identifié un gène qui est exprimée uniquement dans le testicule et qui est aussi présent uniquement dans le génome des animaux mâles (donc potentiellement sur le chromosome Y de cette espèce dont de le déterminisme est de type XX/XY). Ce gène que nous avons nommé SEX, serait donc un potentiel déterminant majeur du sexe chez le brochet et ce projet a pour but d'explorer les conséquences de la surexpression ou de l'inactivation ciblée de SEX. Si ce gène est bien le déterminant majeur du sexe alors le phénotype des animaux mâles inactivés pour SEX sera un phénotype femelle et celui des femelles surexprimant SEX sera un phénotype mâle. L'intérêt scientifique de ce projet (soutenu par un contrat ANR, projet PhyloSex, ANR -13-ISV7-0005) réside dans le fait qu'à l'heure actuelle seulement quelques déterminants majeurs du sexe ont été décrits chez les poissons et ceux-ci sont extrêmement peu conservés. Ces expériences permettront de confirmer le caractère nécessaire et suffisant de ce gène pour la différenciation testiculaire chez le brochet. Pour mener à bien ce projet et du fait de la faible efficacité des techniques actuelles de transgénèse et d'inactivation in vivo (de l'ordre de 1-5%) nous devons expérimenter sur quelques centaines d'animaux (Réduire). Aucun effet néfaste pour l'animal n'est anticipé dans nos expériences dans la mesure où compte tenu des connaissances acquises sur d'autres espèces, seule le sexe de l'animal serait changé (Raffiner). Enfin aucune alternative in vitro n'est envisageable à ce jour pour répondre à cette question (Remplacer).

3507. L'apoptose est une mort génétiquement programmée essentielle pour la cellule. La dérégulation de la machinerie apoptotique entraîne d'importantes maladies telles que le cancer. Parmi les protéines clés de déclenchement de l'apoptose se trouve la caspase-9. Cette caspase est sous forme inactive quand elle est associée à une autre protéine, la PP2A, empêchant ainsi l'apoptose de la cellule. Ce projet a pour but de briser l'interaction de caspase-9 et PP2A et entraîner la mort de la cellule tumorale.

Nous utilisons des peptides capables d'empêcher spécifiquement l'interaction caspase-9/PP2A dans les cellules tumorales. Ces peptides entrent facilement dans la cellule sans endommager la membrane cellulaire pour atteindre leur cible, 'caspase-9/PP2A'. Afin d'améliorer l'efficacité antitumorale de ces peptides, démontrée sur les cellules cancéreuses in vitro et également in vivo chez la souris, de nouveaux peptides plus stables dans le sang ont été fabriqués. Notre objectif est d'optimiser l'administration de ces peptides dans le but d'améliorer leur efficacité thérapeutique.

Cette étude comprend 3 parties : étude de la pharmacocinétique qui permet de doser le peptide dans le sang des animaux au cours du temps pendant 24h et évaluer sa stabilité. Le nombre de souris nécessaire est 150.

La deuxième étude est la toxicité des peptides qui permet de définir la dose des peptides pour laquelle aucune toxicité n'est observée. Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est 12 souris.

Enfin Nous allons évaluer l'effet de dose et le protocole d'administration de peptide pour avoir le maximum d'efficacité antitumorale. Le nombre de souris pour les expériences d'efficacité est de 144.

L'efficacité de ces peptides sera évaluée sur un modèle de xénogreffe de cancer de sein humain.

Ce modèle est obtenu à partir des fragments de tumeurs de patients implantés directement sur les souris dont leur système immunitaire est déficient, afin de favoriser le développement de xénogreffes de tumeurs. Ces xénogreffes sont actuellement le modèle tumoral le plus proche des tumeurs des patients.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre total de souris nécessaire est de 306 souris. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire et tient compte d'une part du taux de prise tumoral sur les animaux (83% pour le modèle de xénogreffe utilisé) et d'autre part pour pouvoir évaluer de façon statistique robuste l'effet des médicaments il faut minimum 10 souris portant une tumeur par groupe. En tenant compte de ces 2 paramètres, il faut greffer 12 souris par groupe.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur comportement. Des prélèvements du sang sont effectués juste avant la mise à mort sous anesthésie générale. Les greffes de la tumeur se font

également sous l'anesthésie générale. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

3508. La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. La thérapie génique, consiste à apporter des gènes thérapeutiques aux cellules « malades » dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le mal fonctionnement d'une protéine essentielle ou les médicaments conventionnels ne sont que de peu d'utilité. Le seul traitement envisageable est alors de pallier cette déficience via l'administration exogène d'une protéine thérapeutique en transférant son gène. L'utilisation d'un gène comme médicament permet d'obtenir l'expression continue d'une protéine thérapeutique au sein des cellules cibles, un atout très désirable. Ces traitements ne peuvent être testés que dans un contexte *in vivo*, dans un système oculaire mammifère car les propriétés pharmacologiques des traitements ne peuvent qu'être évaluées dans un compartiment oculaire intact et fermé. Dans ce projet, nous testons des nouveaux traitements applicables à une grande variété de maladies oculaires, plus particulièrement des dégénérescences rétinienne héréditaires. Nos traitements consistent en une unique injection intraoculaire ou systémique d'un vecteur transporteur de gène thérapeutique. L'objectif est d'étudier l'efficacité de transfert de gène et les effets thérapeutiques de ceux-ci dans des souris (*mus musculus*) traités afin d'évaluer la qualité de la vision après le traitement. Pour ces études, un total de 264 de 3 souches de souris (c57bl6, rd1, rd10) seront utilisés. 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.

3509. Le projet a pour but d'étudier la régénération de l'os et du cartilage *in vivo*. En effet, la régénération de l'unité os-cartilage est très complexe. Aujourd'hui les seules thérapeutiques disponibles consistent à régénérer une des deux parties mais sans réelle cohésion ce qui oblige à de nombreuses ré-intervention chirurgicales lourdes pour le patient. Dans le pire des cas, il est parfois nécessaire de remplacer une articulation complète par une prothèse. Après des études *in vitro* poussées, il est ensuite nécessaire d'étudier *in vivo* les performances des biomatériaux actifs conçus en terme de toxicité pour le futur patient, de compatibilité avec les tissus vivants, et d'efficacité. Notre domaine d'étude nécessite donc d'implanter nos biomatériaux au sein de petits animaux tels que la souris et le rat afin de reproduire au maximum les futures conditions d'utilisation prévues pour leur application en clinique.

Le choix des animaux s'est porté sur la souris pour la simplicité du modèle, et sur le rat pour la taille des implants dans l'articulation. Étant donné le nombre d'analyses nécessaires (imageries, étude des protéines exprimées, étude de la minéralisation, étude des propriétés mécaniques, etc.) afin de valider les résultats, le nombre d'animaux (rats et souris) utilisés a été évalué à :

- 545 souris pour les 5 ans
- 150 rats pour les 5 ans

Tous les actes chirurgicaux seront réalisés sous anesthésie générale par injection. Le réveil complet des animaux sera activement surveillé le jour de l'intervention et le suivi journalier de leur bien être sera ensuite mis en place.

3510. Dans les systèmes d'élevage de poulets de chair, la mortalité des poussins est plus 1 grande pendant les 10 premiers jours de vie. Pendant cette période, les poussins sont soumis à plusieurs sources de stress telles que des changements de température, de confinement, des vibrations pendant leur transport entre le couvoir et leur installation en bâtiment d'élevage et, la plupart du temps, ils sont privés d'eau de boisson et de nourriture. Si les poussins peuvent puiser leurs ressources dans le sac vitellin pendant les jours qui suivent l'éclosion, il est maintenant bien démontré que leur environnement précoce influence le comportement des poulets adultes, leurs performances de production et leur sensibilité aux maladies. Pour réduire l'usage des antibiotiques et respecter le bien être des poulets dans les systèmes d'élevage, la gestion de la santé des animaux doit évoluer vers le développement de nouveaux moyens prophylactiques et thérapeutiques. Comme un état de stress persistant représente un risque potentiel de problèmes de santé à venir, son dépistage peut contribuer à une meilleure gestion de la santé des animaux et permettre de proposer des pratiques d'élevage pour atténuer les expériences négatives vécues par les jeunes animaux. Les objectifs de ce projet sont de i) caractériser les modifications comportementales, physiologiques et pathologiques induites par une mise en place tardive des poussins en élevage, ii) identifier des biomarqueurs d'un état de stress persistant. Plusieurs approches seront testées à partir de l'analyse de prélèvements biologiques. L'analyse du transcriptome des cellules sanguines est une option, deux autres approches seront basées sur l'analyse du microbiote et des composés organiques volatils dans les fèces des animaux, iii) tester des pratiques alternatives pour prévenir les effets à moyens et long terme des expériences négatives vécues précocement par les poussins. La capacité que les poussins pourraient mobiliser pour s'auto-médicamenter en situation de stress sera testée dans un environnement dans lequel plusieurs formules de métabolites secondaires de plantes médicinales seront mises à disposition.

Le développement de méthodes et d'outils de dépistage d'un état de stress, ainsi que l'évaluation des effets de pratiques d'élevage alternatives chez le poussin ne sont pertinents et envisageables que sur l'animal vivant et nécessitent des approches multicritères. Pour répondre aux objectifs de ce projet, 3 expériences seront réalisées incluant au total 702 animaux dont 654 retourneront en bâtiment d'élevage à l'issue des expériences. Le nombre d'animaux engagé dans ces expériences est défini pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle des différents facteurs comportementaux et biologiques analysés.

3511. Dans le cadre du programme national de restauration de l'esturgeon européen (*Acipenser sturio*), l'acquisition de connaissances sur le comportement migratoire des juvéniles est primordiale pour identifier ses habitats préférentiels et adapter les pratiques de restauration (e.g. modalité d'élevage avant le repeuplement, protection des habitats). Les méthodes

de télémétrie permettent d'étudier à distance les animaux dans le milieu naturel. La réduction de la taille des marques permet de suivre des animaux de plus en plus petits. Dans le cas de l'esturgeon européen, nous avons pu marquer et suivre dans le milieu naturel des animaux âgés de 9 mois (en moyenne 31 cm pour 165 ±53 g) en 2009 afin d'étudier leurs patrons de dévalaison (i.e. migration vers l'aval) entre le fleuve et l'estuaire. La récente miniaturisation des marques acoustiques permettrait de marquer des individus de 14 g (poids des marques=0.28g) c'est-à-dire des esturgeons dès 3 mois. Le suivi individuel d'esturgeons de 3 mois en milieu naturel n'a jamais été réalisé. Dans le cas de l'esturgeon européen, nous avons peu de connaissances sur sa phase de vie en eau douce avant 9 mois. De plus, dans le cadre d'un travail de thèse qui démarre, nous souhaitons pouvoir comparer la dispersion des jeunes esturgeons européens âgés de 3 mois issus de différentes modalités d'élevage dans le cadre du programme de repeuplement de cette espèce en Gironde. En 2014, nous souhaitons réaliser une expérience à la fois sur la faisabilité du marquage de poissons de cette taille et sur la faisabilité du suivi en milieu naturel. Si cette expérience préliminaire est concluante, à l'automne 2014, 2015 et 2016, cette technique sera utilisée pour suivre des individus de cet âge en milieu naturel (50 esturgeons européens marqués et suivis en milieu naturel par année). Cependant, avant de marquer des esturgeons européens de 3 mois, nous souhaitons évaluer l'impact du marquage en fonction du poids et de la taille initiale du poisson en termes de croissance, de mortalité et de comportement de nage sur une espèce modèle, l'esturgeon sibérien (*Acipenser baeri*). Ces tests sur les esturgeons sibériens permettront de déterminer la taille minimale de marquage de l'esturgeon européen. Le test sera réalisé sur 100 esturgeons sibériens (50 marqués et 50 témoins) issus d'une pisciculture.

Les exigences de remplacement, réduction et raffinement ont été prises en compte dans ce protocole. Il est nécessaire d'avoir recours à des animaux car il s'agit d'étudier leur comportement en milieu naturel. Dans la littérature, il n'existe aucune étude sur le marquage intrapéritonéal d'une espèce d'esturgeon de cet âge. C'est pourquoi, avant de pratiquer ce marquage sur l'espèce classée en danger critique d'extinction qui nous intéresse, nous souhaitons réaliser des tests préalables sur une espèce modèle afin de valider la taille et le poids minimum de marquage possible sans impact sur la survie ou le comportement des individus. Afin de réduire au minimum la douleur, quelle que soit l'espèce, l'implantation des émetteurs sera pratiquée sous anesthésie générale à la dose recommandée pour l'espèce en question. Pendant la chirurgie, une solution d'anesthésique plus légère sera diffusée et permettra d'humidifier également les branchies. Le réveil des animaux sera surveillé. Pendant la période d'élevage, les animaux seront nourris à satiété. Les mesures de croissance seront réalisées sous anesthésie. Les effectifs choisis sont minimaux afin de permettre une analyse statistique avec des tests paramétriques.

3512. Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'évaluer l'efficacité d'un produit vétérinaire sur la réduction de l'accumulation de la plaque dentaire et du tartre chez le chien. Pour le développement d'un produit vétérinaire visant l'hygiène bucco-dentaire (de type lamelle à mâcher, gel dentaire ou aliment. ..), 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, 5 à 10 chiens (en fonction des contraintes statistiques) seront traités à la posologie recommandée par le fabricant. Un groupe d'animaux non traité pourra être inclus pour servir de témoin. Pour augmenter la puissance statistique des résultats et limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir une autre formulation à l'issue du premier test.

Avant le début du traitement, un détartrage/polissage sera réalisé sur toutes les dents des animaux inclus. L'efficacité des différentes formulations sera ensuite évaluée et/ou comparée sur la base de l'évaluation de l'accumulation de la plaque dentaire et du tartre. Ces interventions, non invasives, seront réalisées sous anesthésie générale de courte durée.

Pour comparer l'efficacité des différentes formulations, l'activité de mastication (durée et rythme) du produit pourra également être relevée.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 180 chiens, ce nombre pouvant être diminué par la réutilisation des animaux.

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

3513. Le phénotype le plus souvent observé dans le contexte physiopathologique de nombreuses myopathies est une atrophie, une infiltration adipocytaire et la présence de fibrose disqualifiant de fait, ou du moins limitant, les rationnels thérapeutiques proposés par la thérapie génique ou la thérapie cellulaire. Le maintien de l'intégrité musculaire a été décrit depuis longtemps comme étant dépendant de l'innervation et de l'exercice. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie musculaire sont encore mal compris. Pour répondre à cette question nous allons explorer les conséquences d'une interruption de l'activité contractile des fibres musculaires sans dénervation donc sans interruption de l'activité électrique. Ceci peut être réalisé en détruisant le système de couplage excitation-contraction au niveau du muscle. Le couplage excitation-contraction est assuré au niveau de structures subcellulaires par deux principaux partenaires moléculaires la sous-unité  $\alpha 1$  S du canal  $Ca^{2+}$  lent récepteur des dihydropyridines (DHPR ou Cav1.1) et le récepteur ryanodine de type 1 (RyR1). Notre objectif est donc d'étudier les conséquences morphogénétiques liées à une inactivation de la sous unité Cav1.1. Pour cela un modèle murin permettra d'étudier les conséquences d'une inactivation de la sous unité Cav1.1. dans un muscle adulte. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 32 souris sauvages et 32 souris invalidées pour l'expression de la protéine myostatine (KO mst-/mst). Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées in vitro avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Dans les

situations de reproduction ou de stress dû à l'expérimentation, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. De la laine de bois pourra être ajoutée afin de permettre la création d'un nid.

La détermination et la caractérisation des voies moléculaires impliquées dans la régulation de la masse musculaire permettront d'identifier de nouvelles cibles moléculaires importantes pour la conservation de l'intégrité du muscle et le maintien de la fonction contractile musculaire.

3514. En Europe, la transplantation d'organe fait face à un manque de don. Les rares organes disponibles sont menacés par un phénomène appelé ischémie/reperfusion, auquel notamment le foie est très sensible. Le concept d'ischémie-reperfusion (IR) consiste en l'augmentation du dommage tissulaire induit par une carence temporaire en oxygène lorsque cet apport est restauré. Ce phénomène est rencontré très fréquemment dans les pathologies aiguës, et concerne notamment les défaillances circulatoires (états de choc), l'infarctus du myocarde, la transplantation d'organes et le clampage vasculaire au cours de la chirurgie hépatique. Dans toutes ces situations se développe une période plus ou moins prolongée d'ischémie. Bien que le traitement vise à restaurer dès que possible l'apport en oxygène, on sait aujourd'hui qu'une telle restauration engendre en elle-même une série de phénomènes dommageables, regroupés sous le terme générique de «lésion de reperfusion». Pour faire face à ce problème majeur de santé publique, il est indispensable de mieux le comprendre. Cela nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme et donc l'usage des modèles animaux. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques de l'IR hépatique nous allons explorer les mécanismes d'interaction hépatocytes/ neutrophiles et tester le potentiel préventif de la modulation de la flore colique sur les lésions d'IR. Cette étude nécessite des approches in vivo et ex vivo chez la souris (fond génétique C57BL/6). Elle nécessitera également des souris invalidées pour le gène NOD1 (souris NOD1-/-). Au total 420 souris générées pour cette étude, devraient être utilisées. Des tests de puissance ont permis de calculer au plus juste le nombre d'animaux indispensable. Les cellules isolées de souris seront utilisées dans plusieurs expérimentations ex vivo afin d'optimiser leur utilisation. Si de nouveaux outils in vitro apparaissent, ils seront utilisés en remplacement des animaux.

3515. Certains cancers sont associés à des virus qui peuvent constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. La découverte de l'association du papillomavirus humain (HPV) à la majorité des cancers du col de l'utérus a valu en 2008 le prix Nobel au Pr H Zur Hausen. Au cours de ces dernières années, il a été aussi montré qu'un sous-groupe de cancers de la sphère ORL, ainsi que des tumeurs du canal anal et du pénis, était associé aux papillomavirus. Il a été estimé qu'environ 5% de tous les cancers sont associés à l'infection par HPV, le plaçant dans les principales causes de développement tumoral chez l'homme.

Il existe des vaccins contre le papillomavirus, mais ces vaccins « préventifs » sont inefficaces lorsque le virus est déjà présent dans l'organisme, et les vaccins disponibles n'offrent pas de protection contre certains génotypes d'HPV qui sont responsables d'environ 30% de tumeurs. Les tumeurs associées à HPV restent graves. Ainsi, les patients ayant un cancer de l'oropharynx ont un pronostic à 5 ans ne dépassant pas 30%. Il n'existe pas actuellement de traitements spécifiques pour les néoplasies liées à HPV, le but de ce projet est de développer de nouveaux traitements visant à cibler le virus et ses activités afin d'améliorer le pronostic de ces cancers. En particulier le projet vise à évaluer l'efficacité de la combinaison d'un nouveau vaccin thérapeutique avec la radiothérapie pour le traitement des cancers des voies aérodigestives supérieures associés aux papillomavirus.

3516. Le lymphome du manteau est une entité particulière de lymphome de l'adulte dont le pronostic est défavorable. A la différence des autres lymphomes agressifs, il n'y a pas de traitement actuel permettant d'obtenir une guérison. Notre objectif est de mieux comprendre la signalisation dans les cellules tumorales pour développer de nouveaux traitements plus efficaces que ceux disponibles actuellement. Ce travail comporte aussi le développement de modèles animaux chez la souris. Nous avons déjà générés des modèles à l'Institut qui permettent dès à présent d'évaluer l'effet de nombreuses molécules en développement. Ce travail est réalisé sur des souris Nude (650 animaux envisagés sur 5 ans). Notre objectif est d'établir de nouveaux modèles plus proches de la maladie observée chez l'homme car ceux actuellement disponibles reposent sur des lignées cellulaires qui ne sont pas toujours le reflet exact des lymphomes observés chez l'homme. Ce travail nécessitera l'utilisation de 200 souris NSG ou raggamc-/- sur 5 ans.

3517. Le lymphome de Burkitt (LB) est une prolifération maligne de lymphocytes B très fortement associée à EBV (Epstein Barr Virus). Son traitement repose sur une chimiothérapie intensive relativement toxique notamment pour les patients fragilisés (sujets âgés, immunodéprimés). De nouvelles approches et des traitements alternatifs sont donc nécessaires. Les résultats obtenus par notre équipe nous ont permis de caractériser une nouvelle cible thérapeutique: Gb3. Ce glycolipide est fortement et spécifiquement exprimé en surface des cellules de LB. Nous avons caractérisé un anticorps monoclonal murin de classe M dirigé contre Gb3 in vitro et nous souhaitons évaluer son potentiel thérapeutique in vivo dans le traitement du LB. Ces travaux seront réalisés sur des souris nude. Nous utiliserons ce modèle car il ne présente aucune anomalie du système immunitaire inné (présence de cellules NK, macrophages, du complément et des cellules présentatrices d'antigène). Cette caractéristique est très importante car l'effet anti-tumoral des anticorps monoclonaux dépend de l'ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) et de la CDC (cytotoxicité dépendante du complément). Pour évaluer le potentiel thérapeutique de notre anti-Gb3 nous souhaitons effectuer un premier travail sur son efficacité seul sur la croissance des tumeurs et un deuxième sur son efficacité en combinaison avec le traitement de référence afin de voir s'il est possible de diminuer les doses de chimiothérapie. Afin de mener ce projet à bien, nous avons réalisé le maximum de nos expériences in vitro (culture cellulaire) avant de faire de l'in vivo (Remplacement). Pour ces deux séries d'expérience nous utiliserons 120 animaux ce qui nous permettra une analyse statistique correcte des différents résultats (Réduire). Des points limites bien

établis et un suivi régulier des animaux nous permettent de respecter la règle des 3R (raffinement). En effet, nous avons planifié le protocole afin de réduire la durée de l'expérimentation et nous aurons recours à des procédures d'euthanasie appropriées (limitation de l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux). De plus, les résultats obtenus seront exploités au maximum grâce à des analyses statistiques.

3518. Les traumatismes de la moelle épinière (TME) touchent 2,5 millions de patients dans le monde et induisent des symptômes allant de troubles neurologiques sensori-moteurs minimes à la tétraplégie complète. Il n'existe aucun traitement efficace. La cicatrice gliale qui se forme après une lésion médullaire, composée d'astrocytes et de microglies, inhibe la repousse axonale en formant une barrière physico-chimique. Néanmoins, nous savons que ces cellules gliales peuvent également favoriser la régénération.

La règle des «3R» sera pleinement appliquée et la mise en place de solutions alternatives à l'expérimentation animale est encouragée. Cependant, les cellules cultivées ne peuvent pas remplacer la complexité physiologique et pathologique que l'on a dans les modèles animaux.

Les modèles animaux de TME représentent donc actuellement le paradigme expérimental le plus pertinent qui reproduit fidèlement la pathologie humaine. Ces approches thérapeutiques ne peuvent être menées que chez l'animal et représentent une étape préclinique capitale et incontournable si l'on projette une application clinique. C'est pourquoi, nous travaillons avec deux sévérités de TME (hémisection et transection) chez la souris. Une hémisection médullaire induira une héli-paraplégie alors qu'une transection induira une paraplégie; dans les deux cas la fonction respiratoire est préservée. Un total de 286 souris (mâles et femelles comprenant 34 témoins non-lésés) sera nécessaires sur une durée de 5 ans. Les souris nous donnent accès aux animaux génétiquement modifiés.

Le premier objectif de notre projet est d'identifier les changements moléculaires et cellulaires dans les cellules gliales au cours des phases aiguës et chroniques après un TME. Ces changements pourraient jouer un rôle bénéfique ou délétère sur la repousse axonale spontanée. En parallèle, nous allons évaluer les fonctions sensori-motrices des souris lésées.

Le deuxième objectif de notre projet consiste à corréliser les données précédemment obtenues avec l'altération tissulaire évaluée par imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les principaux résultats seront 1) d'identifier les gènes "bénéfiques" et « délétères» sur la régénération spontanée exprimés spécifiquement par les cellules gliales, 2) de corréliser les résultats moléculaires, cellulaires et comportementaux et (3) de définir des fenêtres de correspondance des altérations tissulaires entre les murins et les Hommes. Notre projet permettra une description séquentielle complète de la formation de la cicatrice gliale au niveau moléculaire et cellulaire et fournira des informations sur les événements sous-tendant l'absence de régénération spontanée après un TME. Il est probable que notre projet débouchera sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement un type cellulaire et applicable à différents temps après la lésion médullaire; ceci est crucial pour les patients blessés médullaires aigus et chroniques.

3519. Le système musculo-squelettique comprend les organes suivants: muscle, tendon/ligament et os, qui interviennent dans le soutien et le mouvement. Le tendon transmet la force générée par les muscles aux os et permet ainsi le mouvement. L'altération d'un des composants du système musculo-squelettique conduit à des problèmes de locomotion. Nous nous intéressons à la réparation de deux composants du système locomoteur, les tendons et les muscles.

La réparation tendineuse reste un défi clinique. La formation et la réparation du tendon sont sous le contrôle de paramètres mécaniques et moléculaires. Le facteur de transcription *Egr1* intervient dans la différenciation tendineuse, au cours du développement, au cours de la vie post-natale et de la réparation tendineuse. Des données *in vitro* indiquent qu'*Egr1* agit en amont de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans la différenciation tendineuse. Nous voulons étudier le lien entre les mouvements mécaniques actifs, le facteur de transcription *Egr1* et les voies de signalisation, TGF- $\beta$  et FGF, dans la formation postnatale du tendon, l'homéostasie et la réparation tendineuse.

De plus, nous souhaitons étudier l'effet de l'apport de cellules souches au niveau du site lésionnel sur la cicatrisation tendineuse. Cette étude nous permettrait ainsi de mieux comprendre les mécanismes mécaniques et moléculaires impliqués dans les processus de réparation tendineuse, mécanismes encore largement méconnus.

La dégénération musculaire conduisant à un défaut de locomotion est une caractéristique constante des dystrophies musculaires chez l'homme. Le processus de dégénération dans les muscles dystrophiques est accompagné de nombreux événements compensatoires tels que la régénération musculaire. L'épuisement du potentiel de régénération des muscles dystrophiques est corrélé avec l'exacerbation des symptômes cliniques. La compréhension du processus de régénération dans des conditions normales ou pathologiques est une étape importante vers la compréhension de la pathophysiologie des dystrophies musculaires. Les cellules satellites sont les acteurs clés du processus de régénération. Nous nous intéressons aux voies de signalisation régulant la prolifération des progéniteurs musculaires. Les facteurs de croissance de la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factors) sont très importants pour la régulation du nombre des cellules satellites.

Notre étude nécessite d'utiliser des animaux pour pouvoir tirer des conclusions sur la réparation des tendons et des muscles. Le raffinement et la qualité de vie est obtenue en enrichissant les conditions d'hébergement des animaux en nid végétal, en réduisant la durée de l'expérimentation et enfin en prévoyant des anesthésiques et analgésiques. Pour cette étude, le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats robustes est de 402 animaux dont 348 souris et 54 rats. Le nombre des animaux mis en jeu dans les procédures expérimentales est réduit au strict minimum nécessaire pour atteindre la validité statistique. De plus, afin de réduire le nombre des animaux utilisés, une approche cellulaire est utilisée en parallèle lorsque la

question scientifique le permet. Ainsi la mécanobiologie du tendon sera étudiée en parallèle in vitro, dans un système de culture de cellules souche en 3 dimensions imitant la formation d'un tendon in vitro.

3520. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la première cause de handicap acquis de l'adulte et la troisième cause de mortalité mondiale. La majorité des AVC (85%) sont des infarctus cérébraux (IC) dont un quart survient avant 65 ans, avec une augmentation de l'incidence dans la population jeune. Avant 35 ans, la consommation de drogues serait le principal facteur de risque de survenue d'un AVC, responsable ou lié à 12 % des IC. La drogue la plus fréquemment consommée est le cannabis avec un lien retrouvé avec la survenue d'IC, mais des mécanismes physiopathologiques encore très mal compris.

L'objectif de notre projet est de déterminer l'effet du cannabis sur la vascularisation cérébrale lors d'une prise ou de prises répétées en imagerie par résonance magnétique (IRM) et en histologie. Pour cela, nous nous intéressons au delta-9-tétrahydrocannabinol (L19-THC), principale molécule à effet psychique du cannabis, dont la proportion dans le cannabis est en augmentation depuis de nombreuses années.

Notre étude doit porter sur des animaux pour connaître tous les mécanismes impliqués et il n'existe pas de méthode de remplacement possible moléculaire ou cellulaire. Pour limiter le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour cette étude, nous devons tout d'abord déterminer avec précision le meilleur moment pour réaliser les imageries cérébrales, correspondant au moment du pic de cinétique du L19-THC dans le sang et le cerveau après son injection à l'animal. Cela n'a jamais été étudié dans le passé.

Nous réalisons cette étude chez 25 +/- 3 rats sous anesthésie générale. Cet animal est le plus fréquemment étudié comme modèle d'AVC avec une vascularisation cérébrale bien étudiée en IRM, avec des méthodes d'anesthésie et des critères de douleur bien connus. Tous les animaux seront anesthésiés par un gaz avant l'injection de cannabis et maintenus anesthésiés jusqu'au prélèvement sanguin et cérébral afin de limiter au maximum la souffrance de l'animal. L'euthanasie en vue du prélèvement cérébral sera réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire sous anesthésie générale. Le nombre d'animaux nécessaire a été calculé et limité au minimum après analyse des données de la littérature concernant la cinétique de molécules cannabinoïdes proches.

Le nombre d'animaux est suffisant pour permettre des résultats fiables, ne nécessitant pas de renouveler une étude du même type avec plus d'animaux.

3521. Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours de deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent leur détection par les différentes techniques d'imagerie.

Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base de Gadolinium et d'Or. Les premières études réalisées avec ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes méthodes d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive. Il est maintenant indispensable de les modifier pour qu'elles reconnaissent les tumeurs de manière spécifique. Cela permettra d'améliorer le diagnostic et de réaliser un suivi de l'effet du traitement.

Une étude réalisée in vitro, nous a déjà permis de montrer qu'en modifiant les particules elles pouvaient reconnaître spécifiquement les cellules tumorales. Une étude préclinique, couplant IRM et imagerie de fluorescence, est maintenant nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Nous avons choisi de réaliser cette étude sur différents modèles de tumeurs cérébrales (primaires ou métastases). Nous étudierons un modèle de gliome humain implanté chez la souris nude. Les souris nudes immunodéficientes représentent le modèle permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet.

Nous travaillerons également sur un modèle de gliome de rat implanté chez des rats et sur un modèle de métastases cérébrales de mélanome implanté chez la souris.

Ces modèles sont connus et bien maîtrisés par nos laboratoires. Nous utiliserons les animaux à un stade où ils ne présentent pas de signes cliniques. Les animaux seront surveillés quotidiennement, ce qui permettra d'anticiper leur souffrance.

Tous les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé.

Dans cette étude, nous utiliserons 204 souris nude, 102 rats et 102 souris C57BL/6J.

Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous avons décomposé l'étude en 2 pré-expériences qui nous permettront de déterminer les paramètres optimaux à utiliser pour l'expérience à proprement dit.

- 1ère pré-expérience : Détermination de la concentration optimale de nanoparticules à injecter (4 animaux par groupe, en prenant en compte les variabilités inter-individus).

- 2ème pré-expérience: Evaluation la cinétique fine de biodistribution des nanoparticules avec les deux modalités d'imagerie (4 animaux par groupe, en prenant en compte les variabilités inter-individus).

- Expérience : Evaluer le ciblage tumoral actif (3 groupes de 9 animaux, nombre nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables).

3522. Effet de l'érythropoïétine recombinante humaine sur l'expression et la localisation de l'aquaporine 4 dans un modèle d'œdème cérébral diffus

L'œdème cérébral post-traumatique joue un rôle central au niveau des lésions ischémiques cérébrales secondaires, et dans le pronostic neurologique des patients cérébrolésés. Les aquaporines (AQP) constituent une classe de protéines membranaires formant des canaux perméables aux molécules d'eau. Les AQP4 sont majoritaires au niveau cérébral. A la suite de lésions

cérébrales traumatiques, une augmentation de l'expression de la protéine AQP4 a été retrouvée. Le rôle exact de ces protéines dans le processus de l'œdème cérébral reste débattu. L'utilisation d'inhibiteurs de l'expression des AQP, dont le Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), permettrait d'étudier leur effet sur l'œdème cérébral post-traumatique. L'érythropoïétine recombinante humaine (rhEpo) s'est révélé une thérapeutique anti-œdémateuse dans un modèle expérimental de TC diffus. Une modulation de l'expression des AQP4 pourrait en être à l'origine. Ce sera l'objectif de ce travail. L'étude portera sur la rat car il s'agit du mammifère le moins évolué possédant un cerveau suffisamment semblable à l'homme pour générer des connaissances pertinentes vis-à-vis de la pathologie humaine. Il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou informatique du fait de l'intégration complexe du modèle étudié au sein du système cérébral.

Un total de 70 rats seront utilisés : quatre groupes de 15 rats seront traumatisés et recevront soit du placebo, soit la rhEpo, soit un inhibiteur des AQP4 (PMA) et deux groupes de 5 rats non traumatisés recevront soit un placebo, soit la rhEPO. L'œdème cérébral post-traumatique sera mesuré par IRM de diffusion à la 4ème heure post traumatique. Une analyse de l'expression des AQP4 par Western blot et de leurs ARNm par RT-PCR sera ensuite réalisée. La localisation des AQP4 sera étudiée par immunohistochimie. L'ensemble des manipulations ainsi que le sacrifice des animaux sont réalisés sous anesthésie générale, avec surveillance continue des animaux par une grille codifiant le niveau de douleur pour pouvoir intervenir immédiatement dès le premier signe de souffrance. Le nombre d'animal est déterminé par un test statistique appliqué à chaque expérience, permettant de réduire au maximum le nombre de rats utilisés sans compromettre la validité scientifique des résultats. Le calendrier prévisionnel de ces manipulations est d'une année.

Notre hypothèse est que le traitement par rhEpo dans notre modèle de TC entraîne une diminution de l'œdème cérébral ainsi qu'une augmentation de l'expression et/ou de la localisation des AQP4. L'utilisation d'un inhibiteur des AQP4 (PMA) devrait diminuer cet effet chez le groupe traumatisé traité par rhEpo, montrant un lien de causalité entre œdème cérébral, AQP4 et traitement par rhEpo.

3523. Afin de mettre au point un modèle de dormance tumorale du mélanome chez la souris, nous avons recours à l'utilisation d'animaux (souris) afin de comprendre les mécanismes qui contrôlent la maladie résiduelle ou la persistance de cellules tumorales malgré une apparente guérison de l'individu après traitement anticancéreux ou exérèse tumorale. Dans ce projet, nous utiliserons des séries de 5 souris immunocompétentes par condition (nombre de cellules injectées, cinétique d'apparition des métastases) soit au total pour l'ensemble du projet, 95 souris seront utilisées. Afin de mimer le processus de maladie résiduelle chez l'homme, nous injecterons des cellules de mélanome (B16 F1-modèle syngénique) au souris afin d'induire un développement tumoral et dès l'apparition d'une masse tumorale palpable, nous réaliserons une exérèse tumorale. Par la suite, nous sacrifierons les souris à différents temps post exérèse et détecterons la présence des cellules tumorales résiduelles. Celles-ci seront isolées *in vitro* afin d'analyser les modifications phénotypiques des cellules dormantes comparées aux cellules tumorales initiales et de mettre en évidence des gènes cibles responsables de la dormance tumorale. Dans un second temps, nous évaluerons la pertinence de ces résultats dans un modèle « human like » afin de se rapprocher le plus possible des conditions cliniques. Pour cela, nous grefferons des équivalents de peau humaine reconstruite *in vitro*, avec des cellules tumorales de mélanome humain (modifiées génétiquement pour un gène impliqué dans la dormance tumorale mis en évidence dans la première partie du projet) sur des souris immunodéficientes. Nous évaluerons l'impact de la modification génétique sur, la tumorigénicité, la dissémination métastatique et leur potentiel à entrer en dormance. Pour cette partie du projet, nous prévoyons 5 souris par condition. Afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées dans cette étude, le choix des gènes impliqués dans la dormance tumorale sera préalablement validé *in vitro* dans la mesure du possible (étude du cycle cellulaire, entrée en quiescence, modification d'expression de protéines clé dans la quiescence/dormance cellulaire, étude dans un environnement de peau humaine reconstruite *in vitro*). Néanmoins, les modèles *in vivo* sont primordiales pour une étude pertinente de la dissémination métastatique et de la dormance.

Grâce à ces résultats, nous espérons apporter de nouvelles connaissances dans les mécanismes de dormance tumorale et ainsi optimiser l'efficacité des traitements anticancéreux en évitant les récives.

3524. L'obésité et le surpoids concernaient 15 et 32% de la population française en 2012 (étude Obépi2012). Les conséquences médicales de l'obésité représentent jusqu'à 10% des dépenses de santé. La recherche des mécanismes aboutissant à ces complications est donc un enjeu sociétal, économique et scientifique majeur. Parmi ces mécanismes, un dérèglement du contrôle de la prise alimentaire aboutissant à une surconsommation a été montré. La prise alimentaire est régulée par de nombreux signaux, à la fois internes et externes. Parmi ces signaux, ceux provenant du tube digestif lors de l'ingestion d'un repas participent à l'arrêt de la prise alimentaire. Lors de la digestion, les nutriments sont détectés par des cellules spécialisées de l'intestin qui vont libérer différents types d'hormones gastro-intestinales. Le nerf vague transmet ces informations au cerveau, qui, en fonction des autres informations sensorielles ordonne ou non l'arrêt du repas. De récents travaux ont montré que la biologie du nerf vague est altérée par la consommation chronique d'un régime riche en lipides chez le rat, résultant en une réduction de la sensibilité du nerf vague aux signaux intestinaux après 6 semaines de régime. Les mécanismes exacts ainsi que le timing des événements à l'origine de ce dysfonctionnement du nerf vague ne sont pas connus. L'objectif du projet est d'étudier la biologie du nerf vague de rats au cours de ces 6 semaines de consommation d'un régime riche en lipides. Le projet est composé de 2 procédures permettant de répondre à ces objectifs. Dans la première procédure, des groupes de 6 rats seront soumis à un régime riche en lipides ou contrôle et sacrifiés après 1, 3 ou 6 semaines afin de prélever le nerf vague et d'en étudier la biologie. La procédure sera répétée une seconde fois pour mettre en culture les nerfs vagues. Dans la deuxième procédure, 2 groupes de 6 animaux seront soumis aux mêmes régimes (riche en lipides ou contrôle)

et leur sensibilité à une hormone déclenchant l'arrêt du repas sera évalué à 1, 3 et 6 semaines. Ces deux procédures nécessiteront 84 animaux (36X2 pour la première et 12 pour la deuxième).

Le recours à l'expérimentation animale est justifié par la complexité de la réponse de l'organisme à un régime riche en lipides qui ne peut pas être reproduit *in vitro*.

3525. La dépression est un trouble psychologique qui se caractérise d'un point de vue comportemental par une humeur triste associée à une réduction de l'activité psychomotrice et à un désintérêt intellectuel. Cette pathologie résultant de facteurs génétiques et environnementaux peut s'avérer très invalidante. Différents antidépresseurs sont actuellement disponibles sur le marché. Leurs effets thérapeutiques reposent sur leur capacité à augmenter la transmission sérotoninergique, noradrénergique et/ou dopaminergique dans le cerveau. Toutefois, en dépit de leur efficacité avérée, ces traitements présentent un certain nombre de limites telles qu'un long délai d'action, le fait que 30% des patients sont résistants ou encore leurs effets secondaires. De plus, ces agents pharmacologiques n'agissent pas sur l'ensemble des symptômes dépressifs, ce qui encourage la Recherche dans le domaine de la psychiatrie à développer de nouvelles molécules présentant un plus large spectre d'action nécessaire à un meilleur profil thérapeutique.

Le 1er octobre 2013, un nouvel antidépresseur, la vortioxétine a été commercialisé aux Etats-Unis. Cette molécule semble présenter une meilleure efficacité que les traitements actuels, notamment grâce à des effets pro-cognitifs remarquables qui sont très peu améliorés par les traitements antidépresseurs actuels. La vortioxétine est un agent pharmacologique multimodal agissant à la fois sur le processus de recapture de la sérotonine mais également sur certains sous-types de récepteurs sérotoninergiques tels que les récepteurs 5-HT1A, 5-HT1B ou 5-HT3. En dépit de ces connaissances, le rôle de chaque cible pharmacologique de la vortioxétine au regard de ses propriétés électrophysiologiques et neurochimiques observés chez l'animal de laboratoire reste peu connu.

Le but de cette étude est de déterminer l'implication du récepteur 5-HT1A et/ou 5-HT3 dans la capacité de la vortioxétine à stimuler la neurotransmission noradrénergique centrale chez le rat Wistar. Cette étude devrait nécessiter l'utilisation de 120 rats auxquels nous appliquerons des techniques d'électrophysiologie et de microdialyse intracérébrale *in vivo* qui ne peuvent être réalisées *in vitro*. En effet, l'activité d'un agent pharmacologique sur la décharge électrique de des neurones noradrénergiques ou la libération de noradrénaline est fortement dépendante des réseaux neuronaux ne pouvant être modélisés par des cellules isolées. Toutefois, afin de limiter au maximum le nombre d'animaux pour cette étude, nous proposons d'utiliser les rats comme leur propre témoin. Ces derniers seront testés lors d'une première séance avec le solvant et lors d'une seconde séance avec les agents pharmacologiques. Il est également envisageable que les rats qui n'auront pas été utilisés pour une l'approche d'électrophysiologie pourra être testés en microdialyse et inversement.

3526. L'épilepsie est une maladie neurologique qui touche environ 1% de la population mondiale. Bien que des traitements efficaces soient disponibles, près de 30% des patients atteints ne réagissent pas à ces traitements. Le vigabatrin (VGB) ou Sabril® est un des rares traitements très efficaces en monothérapie pour les épilepsies résistantes aux traitements courants ou pour les spasmes infantiles (épilepsie rares du nourrisson). Cependant l'administration chronique de VGB présente un effet secondaire grave connu caractérisé par des dommages irréversibles au niveau de la rétine, qui se manifeste par une réduction du champ visuel. Cette toxicité rétinienne du VGB semblent liée une déficience en taux plasmatiques de taurine, observée tant au niveau expérimental chez le rat, que chez les patients traités. Ainsi, il a été montré chez le rat qu'une supplémentation en taurine protège partiellement des dommages rétiens du VGB. Récemment, des données en histologie et en imagerie obtenus chez le rat, le chien et l'homme ont montré que le VGB peut provoquer des œdèmes intra-myéliniques réversibles après arrêt du traitement.

Le but de ce projet est donc d'évaluer la toxicité rétinienne et cérébrale du VGB qui pourrait être responsable visuel et de troubles neurocomportementaux. Par ailleurs, il sera testé un analogue du VGB, le CPP-15 afin de déterminer s'il présente une toxicité rétinienne et cérébrale, et s'il induit une déficience en taurine plasmatique. Enfin, puisqu'une telle déficience en taurine a été incriminée dans la toxicité du VGB, nous vérifierons qu'une supplémentation nutritionnelle en taurine peut prévenir cette toxicité rétinienne et cérébrale.

Les rats utilisés seront des rats albinos (souche Wistar) car il a été montré que le Vigabatrin, à la dose testée de 200 mg/Kg, ne provoque quasiment pas de lésions rétiennes chez des rats pigmentés. Durant les 60 jours de suivi *in vivo* des rats Wistar traités, les animaux seront surveillés quotidiennement pour vérifier les points limites.

L'utilisation de l'imagerie rétinienne *in vivo* permettra de suivre l'évolution de la dégénérescence rétinienne afin de répéter les acquisitions à différents temps sur le même animal, ce qui réduit de façon importante le nombre d'animaux à utiliser pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Sur les 3 ans de l'étude, le nombre estimé de rats Wistar utilisés sera de 360.

3527. La rétinopathie pigmentaire est une atteinte rétinienne conduisant inexorablement à la cécité. Elle est due à la mutation au sein du gène de la rhodopsine, une protéine exprimée dans les photorécepteurs à bâtonnets, responsables de la vision nocturne, qui provoque la mort progressive de ces bâtonnets. Mais la perte de ces bâtonnets entraîne également une dégénérescence secondaire des autres neurones de la rétine, tels que les cônes puis les cellules ganglionnaires.

L'une des stratégies thérapeutiques pour lutter contre la venue de la cécité est de prévenir l'apparition de la dégénérescence secondaire des autres neurones rétiens par l'administration de molécules ayant propriétés neuroprotectrices. Il n'existe actuellement aucun traitement, ni préventif ni curatif, permettant d'éviter la dégénérescence secondaire des neurones rétiens.

La taurine est une molécule ayant un rôle essentiels pour le maintien de la survie des cônes, comme des cellules ganglionnaires, dans la mesure où une déficience en taurine induite une dégénérescence de ces neurones. L'utilisation des modèles d'animaux de rétinite pigmentaire, qui présentent des mutations similaires à celles observées chez l'homme, permet de tester l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules d'intérêt. L'objectif de ce projet est ainsi d'évaluer l'effet protecteur de traitement chronique par la taurine chez ces modèles animaux. Pour ce faire, nous utiliserons la souche de rats mutants « P23H », en raison de leur mutation sur le gène de la rhodopsine, et la souche de souris consanguines C3H, en raison de leur mutation dans le gène de la phosphodiesterase. Ces deux souches, considérées comme des modèles validés de rétinopathie pigmentaire, montrent une perte progressive des photorécepteurs. Pour chacune d'entre elle nous utiliserons les contrôles sauvages correspondant ne portant pas les mutations décrites, à savoir les rats de souche Sprague-Dawley et les souris de souche C57BL/6J. En conséquence 300 rats et 300 souris seront utilisés soit un nombre total d'animaux équivalent à 600 sur les 5 ans.

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.

3528. La toxoplasmose est une maladie parasitaire provoquée par *Toxoplasma gondii*. Cette parasitose a une forte incidence en médecine vétérinaire (avortements des ovins) et en santé humaine (avortements et malformation fœtales). Le développement d'un vaccin est une stratégie envisageable puisqu'une immunité protectrice à long terme est induite après une primo-infection naturelle par *T. gondii*. De nombreux essais de vaccination ont été effectués dans des modèles animaux avec des extraits parasitaires ou des parasites vivants atténués. Dans tous les cas, une protection partielle est observée bien que les vaccins vivants atténués induisent la protection la plus efficace.

La détermination du rôle de l'installation et du maintien du parasite dans la protection à long terme de l'hôte vacciné contre la toxoplasmose avec une souche vivante atténuée est une question fondamentale qui demeure très discutée en vaccinologie. Elle est primordiale pour définir une stratégie vaccinale entre un vaccin vivant atténué présentant l'avantage d'être très efficace, mais ayant l'inconvénient de pouvoir persister à long terme chez l'hôte, ou des vaccins inertes, sans danger, mais qui sont jusqu'à présent peu efficaces contre la toxoplasmose.

Cette relation a été bien étudiée chez d'autres protozoaires. Dans le cas de la leishmaniose, il a été clairement montré que le maintien du parasite était nécessaire au maintien d'une protection à long terme. En ce qui concerne la toxoplasmose, très peu d'études ont été menées essentiellement avec 2 souches de vaccins vivants atténués et elles restent contradictoires à ce jour. Le but du projet est donc de déterminer si l'installation du parasite sous forme de kyste est nécessaire au maintien de la protection à long terme.

Pour cela nous utiliserons une souche vaccinale atténuée kystique qui sera modifiée pour empêcher son enkystement in vivo. Les animaux utilisés sont des souris. C'est l'espèce utilisée dans la littérature pour les études de protection et de vaccination sur la toxoplasmose. Elle est un hôte naturel de *Toxoplasma gondii*.

La souche des souris utilisée est la souche Swiss OF1 qui est une souche de souris non consanguine donc plus représentative de la diversité observée chez les hôtes d'intérêt (ovin et humain) et qui a été utilisée pour la plupart des études avec la souche vaccinale utilisée dans le projet. Ces expériences sont des expériences de vaccination et ne peuvent pas être réalisées in vitro et nécessite donc l'utilisation d'animaux. Par contre par souci du respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été calculé et justifié dans chaque procédure. Le nombre total de souris pour ce projet pour les 5 ans est de 174 souris au maximum. Le projet est découpé en 4 procédures expérimentales. De même, pour limiter le nombre d'animaux utilisés, les procédures sont indépendantes et seront effectuées dans l'ordre chronologique.

Les procédures 1 et 2 ont pour but de mettre en évidence les conditions expérimentales permettant d'empêcher l'installation des kystes.

Les procédures 3 et 4 permettront de montrer la relation entre l'absence d'installation de kyste et le maintien de la réponse protectrice. Les procédures 1,2 et 3,4 sont indépendantes et en fonction des résultats des procédures 1 et 2, les procédures 3 et 4 ne seront pas forcément réalisées ce qui fait un nombre minimum de souris de 84.

3529. L'objectif du projet est d'étudier les bases neurobiologiques de l'imitation vocale chez la perruche ondulée (*Melopsittacus undulatus*) adulte. Dans ce cadre, il sera tout d'abord recherché le rôle fonctionnel de deux régions cérébrales, par une étude de lésion et par une étude de stimulation. Puis, les propriétés sensorielles et motrices des neurones de ces régions seront caractérisées à partir d'enregistrements de l'activité électrophysiologie. Le but sera de savoir si certains de ces neurones peuvent être considérés comme des neurones miroir. Actuellement des théories proposent l'idée selon laquelle l'imitation reposerait sur la mise en jeu de tels neurones et certaines hypothèses suggèrent que des pathologies, telles que l'autisme, pourrait notamment être associées à des déficiences conduisant à la non-mise en place des systèmes de neurones-miroir.

Dans le cadre de la règle des 3R, le choix du modèle animal est lié au fait que, chez peu d'espèces animales, les individus sont capables d'imiter les vocalisations de leurs congénères. Parmi les espèces qui montrent de telles capacités figurent les oiseaux de la famille des psittacidae, dont font partie les perruches ondulées. Des études comportementales ont, en effet, montré que les perruches adultes se mettent rapidement à imiter leurs congénères lorsqu'un nouveau groupe social est établi. Au cours des expérimentations, nous suivrons exactement la méthodologie utilisée dans ces études comportementales déjà publiées.

Ainsi, nous n'aurons pas à utiliser des oiseaux pour mettre au point le protocole expérimental. Nos trois séries d'études seront réalisées chez un total de 62 oiseaux. Au cours de ces dernières années, des études neuro-anatomiques se sont intéressées au cerveau des perruches, un atlas stéréotaxique des différentes régions cérébrales a été mis au point et certaines régions cérébrales sont suspectées jouer un rôle dans l'imitation, ce qui nous permet de cibler nos études sur ces régions et ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentations seront conduites sur un petit nombre d'oiseaux à la fois ce qui permettra d'adapter le protocole expérimental au fur et à mesure et de ne collecter que le nombre de données nécessaires pour obtenir suffisamment de puissance statistique pour les résultats. De plus, l'acquisition d'un système d'enregistrement multi-électrodes qui permet d'enregistrer simultanément l'activité de plusieurs neurones et le développement de nouvelles méthodes d'analyse de l'activité neuronale nous permet actuellement d'obtenir un très grand nombre de données électrophysiologiques à partir d'un nombre réduit d'oiseaux. L'étude de la communication vocale des oiseaux nécessite qu'ils soient dans les meilleures conditions. Afin de réduire le stress lié à la manipulation des oiseaux, les sujets seront, au quotidien, individuellement entraînés à être manipulés par les expérimentateurs. Les oiseaux seront contrôlés au quotidien afin d'évaluer les niveaux potentiels de douleur et de souffrance. Un antalgique sera administré lors des anesthésies chirurgicales et tant que des signes extérieurs de douleur seront observés.

3530. La majorité des bovins sont écornés pour améliorer la sécurité lors des manipulations et diminuer le risque de blessures entre animaux. Quand les veaux sont écornés avant 2-3 mois, on parle d'ébourgeonnage. L'ébourgeonnage thermique, qui est la pratique la plus utilisée, détruit les tissus qui entourent les cornillons et qui contiennent les cellules à partir desquelles les cornes se développent. Pour l'animal, cela entraîne des sensations douloureuses d'origine nerveuse et inflammatoire.

Selon la réglementation, lorsque le bovin est âgé de plus de 4 semaines, l'ébourgeonnage doit être réalisé sous anesthésie locale ou générale par un vétérinaire.

En dessous de 4 semaines d'âge, cet acte ne nécessite pas d'anesthésie et doit être effectuée par des personnes expérimentées (CE 21/10/1988). En France, l'arrêté du 5 octobre 2011 précise que l'écornage peut être réalisé par des personnes non vétérinaires, habilitées sous certaines conditions de formation ou d'expérience professionnelle. La maîtrise de l'acte par l'éleveur implique qu'il soit capable d'identifier les actions potentiellement douloureuses pour l'animal afin de les gérer. Or, à ce jour, aucun outil multiparamétrique d'évaluation de la douleur lors de l'ébourgeonnage n'a été mis au point.

Les moyens permettant de réduire la douleur sont l'administration d'une combinaison entre un sédatif, un anesthésique et un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). En France, les éleveurs sont autorisés à administrer (sur prescription vétérinaire) un sédatif et un AINS, mais ne sont pas autorisés à pratiquer une anesthésie locale. Or, l'efficacité du couplage d'un sédatif avec un anti-inflammatoire pour réduire la douleur n'est pas connue.

Enfin, en France, l'ébourgeonnage est souvent réalisé au-delà de 4 semaines d'âge.

Or, l'âge des animaux a une influence sur leur perception de la douleur. Toutefois, cet aspect est mal documenté dans le cas de l'ébourgeonnage thermique réalisé à 3 semaines vs. 8 semaines.

Ainsi, cette étude comporte trois objectifs :

- Elaborer et valider, chez le veau, une grille d'évaluation de la douleur par une approche multiparamétrique,
- Comparer la perception de la douleur des veaux âgés de 3 vs 8 semaines,
- Evaluer le niveau de réduction de la douleur par différents moyens pratiques.

L'objectif du projet dans lequel s'inscrit cette étude est de fournir aux éleveurs des recommandations pratiques sur : la reconnaissance des signes de douleur chez le veau et les moyens de lutte.

Soixante veaux (30 veaux Prim'Holstein, 30 veaux Charolais) des deux sexes seront utilisés. Ils seront répartis dans 6 lots expérimentaux de 10 animaux. La taille de l'échantillon a été calculée à partir des travaux précédents de notre équipe (effectif nécessaire pour mettre en évidence une variation de cortisol de 2.25 ng/ml entre groupes).

Ces veaux seront ébourgeonnés ou non (lot témoin) et recevront différents traitements antidouleurs. Ils seront suivis à partir de l'âge de 3 semaines, pendant 15 jours : 7 jours avant et 7 jours après l'ébourgeonnage. Parmi ces 60 veaux, 20 veaux témoins (non écornés à 3 semaines) seront réutilisés à 8 semaines d'âge et ce selon la même procédure. Nous enregistrerons des données comportementales (comportement social, postures, activités...), physiologiques (fréquence cardiaque et respiratoire, dosage de cortisol plasmatique ...), zootechniques (croissance, prise alimentaire) et sanitaires (évolution de la plaie, diarrhée...).

3531. En conditions naturelles ou artificielles, les capacités d'apprentissage et de mémoire d'un animal sont fondamentales pour l'adaptation de ce dernier à ses conditions de vie. Ainsi les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale, décrites dans de nombreuses espèces animales, sont importantes pour apprendre et mémoriser l'emplacement des sources de nourriture, d'eau et éviter des lieux dangereux dans un environnement dans lequel l'animal évolue. Les études mammifères ont bien montré que ces capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale impliquaient la mise en jeu d'une structure cérébrale, l'hippocampe. Elles ont aussi démontré que l'état émotionnel de l'animal pouvait altérer ces capacités d'apprentissage et de mémoire. De telles connaissances manquent encore chez l'oiseau d'élevage. Dans ce projet nous souhaitons (1) examiner, chez la caille japonaise, si l'hippocampe joue bien un rôle critique dans la mémoire spatiale et (2) grâce à deux lignées de caille japonaise ayant soit une forte émotivité ou une faible émotivité, nous souhaitons également examiner l'implication de l'hippocampe dans la mémoire spatiale selon l'état émotionnel de l'oiseau.

Quatre expériences utilisant un total de 120 cailles japonaises seront réalisées. Les expériences 1 et 2 consisteront à tester les oiseaux dans des dispositifs d'apprentissage et de mémoire spatiale et à vérifier que l'hippocampe est bien impliqué dans ces

apprentissages. Dans les expériences 3 et 4, grâce à des lignées d'oiseaux qui ont des niveaux d'émotivité forte ou faible nous examinerons l'influence de l'émotivité sur les performances d'apprentissage et de mémoire ainsi que l'influence de l'émotivité sur le fonctionnement de l'hippocampe.

Le rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale et la modulation de son fonctionnement par l'état émotionnel de l'individu sont bien connus chez l'homme et de nombreux mammifères. De telles données, moins nombreuses, existent aussi chez certains oiseaux (corvidés par exemple) considérés comme étant plus évolués, plus intelligents que les oiseaux d'élevage comme la poule ou la caille japonaise. Les résultats de nos études permettront de savoir si on peut généraliser ces connaissances à des oiseaux d'élevage. Si tel est le cas, elles pourront également contribuer à conforter l'idée que les oiseaux d'élevage ont aussi des capacités cognitives relativement évoluées, que ces capacités sont bien modulées par l'état émotionnel de l'animal et impliquent des structures neurobiologiques comparables aux autres espèces.

Cette étude s'intéressant aux capacités cognitives chez la caille japonaise ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude *in vitro* ou une étude de modélisation n'est envisageable. 120 cailles japonaises sont requises ce qui constitue un nombre minimum compte-tenu de la mise en œuvre des procédures expérimentales et des aléas expérimentaux. Toutes les mesures (conditions d'élevage enrichies, soins, médications si nécessaire) seront prises pour assurer le bien-être des oiseaux et supprimer tout mal être ou pathologie éventuelle.

3532. La drépanocytose est la première maladie génétique au monde. Elle se traduit par la synthèse d'une hémoglobine anormale (HbS) qui, sous sa forme désoxygénée, polymérise et entraîne des modifications structurelles des globules rouges (GR) qui prennent alors la forme d'une faucille, deviennent plus fragiles, plus rigides et moins déformables.

Chez les patients drépanocytaires (HbSS), la fragilité des GR falciformes entraîne leur destruction en excès, aboutissant à une anémie chronique (Le. faible taux de GR dans le sang) associée à une faible oxygénation tissulaire.

Plus rigides et moins déformables, les GR falciformes ont tendance à se bloquer dans les microvaisseaux, aboutissant à des crises vaso-occlusives (CVO) particulièrement douloureuses pouvant causer la défaillance de certains organes (rate, reins, cerveau, poumon, foie, os ...) et mettre en jeu le pronostic vital des patients.

Si nos travaux conduits sur des patients drépanocytaires montrent des modifications du tissu musculaire signifiant un possible défaut dans l'approvisionnement et l'utilisation de l'oxygène par le muscle, la traduction métabolique de ce remodelage au niveau du muscle travaillant est à ce jour inconnue. Par ailleurs, l'exercice musculaire aigu intense pourrait avoir des effets délétères pour les sujets HbSS. De ce fait, l'activité physique n'est dogmatiquement pas recommandée pour ces patients, mais ceci ne repose sur aucune étude scientifique. Notre premier objectif sera donc d'étudier l'influence de la drépanocytose sur le métabolisme énergétique et l'oxygénation musculaire lors de protocoles standardisés de repos-stimulation (à plusieurs niveaux d'intensité) récupération.

Ces données nous permettront également d'évaluer l'intensité critique à partir de laquelle l'exercice musculaire provoque une CVO.

Malgré la fréquence des CVO chez les individus drépanocytaires, les conséquences métaboliques de l'ischémie (diminution de l'apport sanguin aux tissus) sont totalement inconnues chez ces patients. De plus, il a été montré que les phases de reperfusion (réoxygénation) subséquentes pouvaient également être délétères. Le second objectif de ce projet portera donc sur l'exploration des phénomènes métaboliques musculaires accompagnant un cycle d'ischémie-reperfusion dans la drépanocytose.

L'exercice physique modéré et régulier est connu pour entraîner des améliorations métaboliques. Parce que la fonction musculaire est un facteur influençant l'autonomie (employabilité) et le bien être des patients (relations sociales), il apparaît comme essentiel de s'y intéresser et de tenter de restaurer, au moins en partie, la mobilité de ces patients. Ainsi, l'activité physique pourrait représenter une piste thérapeutique dans le traitement de la maladie. Notre troisième objectif sera donc d'explorer les effets de l'entraînement en endurance sur le métabolisme énergétique du muscle travaillant et les réponses métaboliques du muscle à l'ischémie/reperfusion.

Si l'exploration *in vivo* des effets de l'exercice intense et de l'ischémie-reperfusion chez le patient drépanocytaire est éthiquement discutable, il existe un modèle de souris drépanocytaires qui présente une physiopathologie et un mode de transmission similaire à l'homme. Dans cette étude, 240 souris seront examinés à l'aide d'un dispositif permettant d'obtenir, de manière strictement non invasive sous anesthésie générale, des informations relatives à la performance mécanique, au métabolisme énergétique, à l'oxygénation tissulaire et à l'anatomie. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés.

3533. Le programme de la formation est établi à l'échelle nationale et comprend les enseignements pratiques de physiologie animale et de pharmacologie-toxicologie. La manipulation d'animaux de laboratoire y est clairement imposée.

Par ailleurs, durant leur cursus nos étudiants suivent une formation qui qualifie le personnel appliquant des procédures expérimentales aux animaux. Cette formation est validée après une réussite aux épreuves théorique et pratique.

L'électromyographie (EMG) intestinale est le seul TP où les étudiants effectuent une chirurgie dans des conditions d'asepsie adaptée. Ils suivent le réveil de l'animal, son retour à l'animalerie et font un suivi post-chirurgical quotidien des animaux avec prise en charge de la douleur (Règle des 3 R : Raffinement).

L'EMG intestinale est :

- une technique couramment utilisée en Recherche et Développement de l'industrie pharmaceutique, domaine principal d'emploi de nos étudiants. Cette technique permet de mettre en évidence à l'échelle de l'organisme entier, les effets de

substances pharmacologiques non visualisables par des méthodes alternatives telles que celles de biologie cellulaire et moléculaire ou ExAO. Cela permet en outre d'appréhender la variabilité interindividuelle.

- la principale méthode d'exploration de la motricité digestive utilisée chez l'homme ou l'animal pour établir un diagnostic. Le TP sur l'électromyographie se déroule en 2 temps : au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine, les étudiants effectuent la chirurgie et la 2<sup>ème</sup> semaine, ils enregistrent in vivo l'électromyogramme intestinal du rat.

Nous utilisons 30 rats (Rat mâle Wistar) au maximum. Ce chiffre est fonction du nombre d'étudiants de la promotion (Règle des 3 R : Réduction - 1 rat par binôme). Le travail s'effectue sur des rats préalablement analgésiés puis anesthésiés, (Règle des 3 R : Raffinement) dans des conditions d'asepsie chirurgicale pour permettre un réveil de l'animal en fin de séance.

Au cours du réveil et après la chirurgie, il y a une prise en charge de la douleur. Des soins post-chirurgicaux sont effectués par les étudiants sous le contrôle des responsables du TP et du bien-être animal.

L'enregistrement in vivo de l'activité des muscles lisses du tractus digestif est effectué une semaine après la chirurgie.

3534. L'obésité est un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés. Au-delà des problèmes métaboliques, il implique un dysfonctionnement du contrôle de la prise alimentaire par le système nerveux central. Pour décortiquer les circuits cérébraux impliqués dans la prise alimentaire, les modèles animaux chez les petits mammifères sont largement étudiés. En particulier, les modèles murins de l'obésité, souris déficientes en leptine, une hormone coupe-faim synthétisée par le tissu adipeux, et les souris rendues obèses par alimentation hypercalorique, sont des modèles d'étude intégrée de la pathologie. L'olfaction est une modalité sensorielle essentielle pour apprécier la nourriture ingérée. En retour, l'état nutritionnel contrôle fortement l'activité olfactive. Nous voulons étudier les interactions olfacto-alimentaires chez les modèles murins de l'obésité, et déterminer si nous pouvons moduler la prise alimentaire des souris obèses en régulant l'activité du système olfactif.

L'étude in vivo des souris obèses est nécessaire et ne peut être remplacée par des études effectuées chez d'autres animaux, comme les insectes, qui ont aussi un système olfactif développé, mais qui ne présentent pas d'obésité qui ressemble aux mammifères. De plus, l'étude des circuits olfactifs en tranche de cerveau, ou sur des cellules olfactives en culture, seraient inappropriées à notre projet puisque nous quantifierons la prise alimentaire des souris in vivo, et que nous voulons connaître l'effet des hormones liés au métabolisme énergétique et circulant dans le sang. De plus, la stimulation olfactive a lieu par inhalation de molécules odorantes pendant l'inspiration, et nécessite donc d'étudier l'animal de façon intégrée.

Dans ce contexte, nous utiliserons des techniques d'enregistrement in vivo comme l'imagerie, l'électrophysiologie et le comportement, déjà employés en routine dans notre équipe, pour être au plus près des mécanismes neuro-physiopathologiques liés à l'obésité.

Le nombre de souris utilisée par groupes sera réduit au minimum suivant le degré de liberté des tests statistiques, et de leur significativité. Enfin, les douleurs provenant des microchirurgies cérébrales seront réduites à leur minimum par l'utilisation d'agents anesthésiques et analgésiques appropriés, un suivi phénotypique des animaux après leur réveil, et un respect strict des points limites.

3535. Parmi les voies biologiques dérégulées et responsables de la prolifération anormale des cellules et le développement de cancer, deux voies ont été décrites dans les cancers de poumons: la voie Hippo et la voie Ras. Ces voies sont altérées également dans les cancers de l'ovaire et le cancer de colon respectivement. La voie Hippo est contrôlée par l'interaction protéique de TEAD avec YAP et TAZ. La voie Ras est contrôlée par l'interaction protéique de Ras avec Raf. Par conséquent empêcher ces interactions représente une approche intéressante pour le traitement des cancers associés à ses dérégulations. Ce projet a pour but de briser ces interactions et entraîner la mort des cellules tumorales. Nous utilisons des peptides qui peuvent d'une part entrer dans les cellules sans endommager la membrane de celles-ci et d'autre part peuvent bloquer l'interaction entre les protéines TEAD avec YAP ou Taz, ou Ras avec Raf.

Dans notre laboratoire, nous avons développé des modèles de xénogreffes de cancer de poumon, de l'ovaire et de colon obtenues à partir de greffe de tumeurs humaines sur des souris adultes immunodéprimées afin de limiter le rejet des tissus humains. Ces modèles peuvent donc permettre d'évaluer l'efficacité antitumorale de ces peptides seuls ou associés à la chimiothérapie.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre de souris utilisées est de 1129 souris. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les points-limites sont observés pour les animaux tout au long des expériences, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie.

3536. La pose d'un diagnostic, l'évaluation d'une thérapie, le suivi d'une chirurgie nécessitent le développement de méthodes non invasives. Les méthodologies d'imagerie non invasive comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou l'échographie sont initialement développées sur les systèmes non vivant avant d'être explorées sur des systèmes cellulaires. Quand leur intérêt/innocuité est établie, une exploration chez le petit animal est entreprise. Cette dernière phase c'est d'ailleurs accompagnée au cours des 10 dernières années par le développement d'appareillage spécifiquement dédiée aux petits animaux dans lesquels les paramètres physiologiques peuvent être maintenus et mesurés.

Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est donc dédiée à l'exploration du rongeur par IRM dans le cadre de:

1. Evaluation de la distribution de nanomédicaments
2. Evaluation de l'intérêt thérapeutique de nanomédicaments
3. Développements méthodologiques pour la visualisation de nanomédicaments ou d'implants biocompatibles

Un maximum de 2110 animaux (910 souris et 1200 rats) pourra être inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées.

3537. Notre projet consiste à développer une méthode de thérapie génique pour l'amyotrophie spinale ou SMA (1 naissance sur 6 000), qui se caractérise par une dégénérescence progressive des motoneurons et conduit à une paralysie et à la mort du patient dans les cas les plus sévères (SMA type 1). Dans 93% des cas, cette perte cellulaire est provoquée par une mutation du gène SMN1 (Survival Motor Neuron 1), dont nous comptons réintroduire la forme originelle dans l'organisme malade en utilisant un vecteur dérivé de l'Adeno-Associated Virus (AAV). Une étude menée par notre équipe a montré qu'une administration intraveineuse (IV) unique de ce vecteur permet de transférer efficacement un gène dans un grand nombre de tissus, y compris le système nerveux central.

Dans le but d'optimiser l'effet thérapeutique de ce modèle, nous souhaitons comparer l'efficacité de différentes voies d'administrations de ce vecteur, IV, ICV (intracérébroventriculaire) et IV-ICV combinée, de deux sérotypes de l'AAV (9 et 10) et à trois doses (2.1010, 4,5.1010 et 1.1011 vg, viral genome). Ces vecteurs seront administrés dans deux lignées murines différentes: SMNΔ7 (perte de poids dès 5 jours et une survie moyenne de 14 jours) et hSMN2 (symptomatiques à la naissance et une espérance de vie de 4 jours). L'administration des vecteurs AAV, à la naissance, permet ainsi d'évaluer de l'importance des bénéfices de notre traitement avant (SMNΔ7, à 2.1010 ou 4,5.1010 vg) et après (hSMN2, à 4,5.1010 ou 1.1011 vg) l'apparition des symptômes. Ce projet ne peut être réalisé que sur ces lignées murines, qui sont des modèles d'étude de la SMA bien caractérisés, et qui permettront de mesurer différents paramètres physiologiques qui refléteront l'importance de leur guérison (survie, poids, activité motrice, intégrité des tissus musculaires et nerveux). Ainsi, dans un premier temps, l'état général des souris sera évalué, avec ou sans traitement, par un suivi quotidien (poids) et une analyse régulière de leur activité locomotrice (actimètre, rotarod et grip test). Ces analyses nécessitent un nombre minimum de 12 animaux/condition pour obtenir des résultats interprétables. Ces données seront complétées par des analyses qualitatives et quantitatives, qui permettront de vérifier que la restauration de l'expression de SMN a permis de préserver les motoneurons, les jonctions neuromusculaires et le tissu musculaire (10 souris/condition). Ainsi, pour l'ensemble de ces expériences, 582 souris KO seront injectées, auxquelles s'ajoutent 48 souris KO et 48 wild-type non-injectées, qui serviront de contrôle. Enfin, ce traitement sera également testé lors du développement embryonnaire (stade E17), dans des embryons issus de femelles hétérozygotes de la lignée hSMN2. Ce protocole nécessite 60 femelles gestantes, qui après mise bas, permettra d'obtenir 72 KO et 37 wild-type.

Plusieurs études ont montré que la restauration du gène SMN1 après l'apparition des premiers symptômes, est peu efficace (fenêtre thérapeutique de 5 jours). Nous envisageons d'améliorer la thérapie génique SMN post-symptomatique, en combinant SMN avec un agent pharmacologique protecteur ou via l'apport d'un gène bénéfique supplémentaire (3 composés seront testés). Pour ce protocole, nous avons planifié l'utilisation de 576 souris provenant des lignées SMNΔ7 et hSMN2 (120 KO recevant le composé pharmaceutique seul, 96 KO recevant le vecteur AAV-SMN, 120 KO recevant le composé combiné au vecteur AAV-SMN, 144 wild-type et 96 KO non traitées, servant de références).

Enfin, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité thérapeutique de notre traitement présymptomatique, nous nous intéressons à une forme diffusible de SMN. Cette forme de SMN pourrait augmenter la proportion de cellules « restaurées » et nous comparerons son effet avec celui de SMN, à partir des résultats obtenus précédemment (144 souris KO issues de la lignée SMNΔ7 recevront cette forme diffusible selon les trois modalités d'administration (IV, ICV, IV/ICV), 24 wild-type et 24 KO non-traitées).

Ce projet respecte pleinement les règles de réduction, de remplacement et de raffinement. En effet, un même animal servira pour différentes expériences (PCR quantitative et western blot, par exemple) et, pour chacune d'entre elles, le nombre d'animaux utilisés a été choisi pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. De plus, des tests *in vitro* ont précédemment montré la forte efficacité des vecteurs AAV pour le transfert du gène SMN. Ainsi, ceux-ci doivent être à présent testés sur des souris modèles de la SMA, avant d'entrer en phase clinique. Ces animaux ont une durée de vie courte et étant donné la sévérité de leurs symptômes, ceux-ci seront systématiquement euthanasiés dès qu'ils atteignent le point limite. Cependant, les premiers animaux traités avec les vecteurs AAV-SMN ont une espérance de vie plus longue (200 jours au lieu de 14) et ne présentent pas les signes cliniques de la maladie. Outre le fait que ces animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne (suivi de poids, activité motrice, évaluation du bien-être général, vérification de l'absence de nécroses ou escarres), toutes les précautions sont prises pour optimiser leurs conditions de vie (nourriture disposée dans la cage, environnement enrichi, etc.).

3538. Les diurétiques de l'anse permettent de traiter l'insuffisance cardiaque congestive et les œdèmes. Leurs effets sur le système cardio-vasculaire sont associés à un effet sur l'excrétion de sodium par le rein, le but d'un traitement avec un diurétique de l'anse étant de maintenir un équilibre en sodium approprié et de réduire le volume des liquides extracellulaires formant un œdème en diminuant la teneur totale en chlorure de sodium dans le corps.

Deux effets indésirables peuvent apparaître lors de l'utilisation de ces diurétiques:

- une augmentation de l'excrétion de potassium,

- une diminution de l'efficacité du diurétique par une réabsorption au niveau rénal du sodium.

Lors d'une précédente étude préclinique, l'utilisation d'un nouveau diurétique chez le chien sain permettait une meilleure élimination du sodium avec moins d'effets indésirables que l'utilisation du diurétique habituellement prescrit.

Afin de déterminer la dose optimale du nouveau diurétique à administrer à un chien insuffisant cardiaque, il faudra démontrer que la dose testée précédemment dans l'étude préclinique présente aussi un effet diurétique chez le chien insuffisant cardiaque dans une étude clinique.

Pour déterminer l'effet du nouveau diurétique sur l'élimination du sodium dans la future étude clinique, la seule mesure qui peut être mise en place simplement et rapidement est la mesure du taux d'excrétion fractionnelle du sodium car elle ne nécessite pas de collecte d'urine importante et de maintien du chien en clinique trop longtemps.

Cette mesure du taux d'excrétion fractionnelle du sodium est tributaire de la mesure de la clairance de la créatinine, un marqueur de la fonction rénale. La mesure sera biaisée si le traitement avec le nouveau diurétique influe directement sur la mesure de la clairance de la créatinine et/ou sur la fonction rénale.

Pour déterminer si la mesure du taux d'excrétion fractionnelle du sodium peut être utilisée dans l'étude clinique pour déterminer les effets du nouveau diurétique chez le chien insuffisant cardiaque, il est souhaitable au préalable d'observer, chez le chien sain, les effets du diurétique sur deux marqueurs fiables de l'état de la fonction rénale que sont le débit de filtration glomérulaire (GFR) et le débit sanguin rénal (RPF) et sur la clairance de la créatinine.

Cette étude sera menée chez l'espèce cible pour laquelle l'utilisation du nouveau diurétique souhaite être développée.

Cette étude sera menée en cross-over ce qui permettra de réduire le nombre de chiens (9 au total) tout en augmentant la possibilité d'observer une différence entre les traitements.

Pour éviter que les chiens ressentent toute douleur ou angoisse tout acte sera réalisé par du personnel formé; les chiens seront au préalable habitués à être contenus pour les prises de sang et les sondages urinaires; ils seront observés au moins une fois par jour et, en cas de problème, un vétérinaire sera consulté et un traitement et/ou l'exclusion de l'étude pourront être effectués; ils resteront peu de temps en cage à métabolisme afin qu'ils aient au maximum accès à leurs conditions d'hébergement habituelles, notamment aux courtes extérieures.

Enfin, les chiens seront placés chez des particuliers à la fin de l'expérimentation.

3539. Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer le potentiel du produit testé à potentialiser ou à réduire l'effet sédatif du thiopental chez le rat.

Au cours de chaque étude, les animaux (10 par groupe) sont traités préventivement avec le produit testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé. Les rats testés reçoivent en plus une injection intraveineuse de thiopental (total de 5 groupes par étude soit un nombre prévisionnel maximum de 3000 animaux sur 5 ans). Dès que les rats s'endorment (perte du réflexe de retournement), la durée du sommeil de chaque rat est enregistrée (l'animal est considéré comme réveillé quand il est capable de se retourner). Ce projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets de l'interaction d'un candidat médicament avec le thiopental. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

3540. La noradrénaline (NA) et dopamine (DA) sont des substances synthétisées au cœur du cerveau et qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions cérébrales comme les processus de récompense, les transitions veille/sommeil ou de l'apprentissage. Les dysfonctionnements des circuits impliquant la NA et la DA sont par ailleurs associés à de multiples pathologies comme la dépression, la schizophrénie ou encore la dépendance aux drogues d'abus. Les cellules nerveuses qui produisent la NA et DA ont de multiples cibles dans le cerveau dont le cortex cérébral, un centre intégrateur des informations sensori-motrices majeur du cerveau.

Notre projet consiste à examiner les effets de la NA et de la DA sur les diverses cellules nerveuses excitatrices et inhibitrices dans diverses régions du cortex cérébral en examinant la régulation de l'activité de certaines enzymes comme la protéine kinase A ainsi que la régulation des propriétés électriques des cellules nerveuses par ces substances. Nous espérons ainsi mieux comprendre les effets cellulaires de la NA et de la DA dans le cerveau normal et pathologique. Dans le cadre de ce projet scientifique, des expériences devront être réalisées sur des tranches de cerveau de souris afin de tester le rôle de la NA et de la DA dans un ensemble interconnecté de cellules nerveuses. Il n'est pas possible de réaliser ces expériences sur des lignées cellulaires en culture car il est nécessaire de conserver la diversité et la connectivité des neurones voisins. Le modèle d'étude choisi est la souris car il existe une vaste littérature sur le sujet et ce modèle permet d'avoir à disposition des animaux génétiquement modifiés. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées DBHcre permettant l'expression spécifique de protéines excitatrices dans les neurones NA. L'expression spécifique nécessitera l'injection de virus dans la zone du cerveau où se trouvent ces neurones d'intérêt. Ce projet sur 4 ans prévoit l'utilisation de 200 souris DBHcre et 16 souris non modifiées soit 216 animaux au total. L'élevage des souris en animalerie est optimisé pour réduire le recours à des souris venant d'élevages extérieurs et minimiser les animaux non utilisés. L'utilisation indifférente des mâles et des femelles d'une même portée et l'optimisation du protocole d'injection permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le modèle de souris étant très largement utilisé en neurosciences un certain nombre d'expériences peuvent être évités car des données sont disponibles dans la littérature. Enfin, les protocoles proposés sont destinés à réduire le stress et la douleur chez les animaux grâce à un hébergement adéquat et un protocole de chirurgie et post-opératoire adapté.

3541. *Streptococcus pneumoniae* est la première cause de pneumonie communautaire et pourrait être le principal agent responsable des pneumonies communautaires d'étiologie inconnue. Le taux de mortalité de la pneumonie à pneumocoques

peut atteindre 30% en fonction de la bactériémie, de l'âge et des maladies sous-jacentes. Mal diagnostiquée et mal traitée, une infection à *S. pneumoniae* peut entraîner une bactériémie, une méningite, une péricardite, un empyème, un purpura fulminans, une endocardite et/ou de l'arthrite.

La méningite à pneumocoques, une maladie qui entraîne fréquemment des lésions cérébrales irréversibles ou la mort, peut se manifester sous la forme d'une complication d'une autre infection à pneumocoques ou bien spontanément, sans aucune maladie précurseur. Elle affecte les personnes de tous âges, mais prévaut chez les enfants de moins de 5 ans, les adolescents et les jeunes adultes, ainsi que les personnes âgées. La maladie peut évoluer en quelques heures d'une affection bénigne au coma, d'où l'importance d'établir un diagnostic immédiat permettant d'administrer un traitement antimicrobien adéquat. Le taux de mortalité en cas de méningite à pneumocoques est de 20 à 30%, souvent malgré une antibiothérapie adaptée pendant plusieurs jours. La mortalité est encore plus élevée chez les très jeunes enfants et les personnes très âgées.

Pour toutes ces raisons, nous souhaitons développer un test permettant le diagnostic précoce de la pneumonie à pneumocoques. Ce test sera un immuno-essai, dont le principe repose sur la réaction anticorps-antigène et qui nécessite donc de disposer d'anticorps sensibles et spécifiques.

Il n'existe pas actuellement d'anticorps commercialement disponibles répondant à nos besoins. L'immunisation d'animaux permettra d'obtenir un immunosérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test. Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, les immunogènes et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 3 ou 5 lapins. Le nombre total de lapins immunisés sera le plus faible possible pour développer les anticorps dont nous avons besoin, en aucun cas, il ne sera supérieur à 20.

La stabulation des animaux sera réalisée dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées au bien-être des animaux (ambiance musicale,...).

3542. Les veaux de boucherie sont des animaux jeunes (moins de huit mois d'âge) élevés pour la production de viande majoritairement à partir d'aliments d'allaitement, qui sont principalement constitués de matières premières laitières (sources de protéines et de lactose), végétales (sources de protéines et de matières grasses) et animales (matières grasses). Au cours de la période d'engraissement, les veaux ont tendance à développer une insulino-résistance, qui se caractérise par la persistance de niveaux élevés des concentrations sanguines en glucose et insuline pendant plus de cinq heures après l'ingestion d'aliment. L'insulino-résistance a des conséquences négatives sur la croissance. La mise en place de l'insulinorésistance serait associée à l'absorption répétitive, rapide et massive des oses issus de la digestion du lactose au cours des premières heures après le repas. L'objectif du projet est de mesurer l'effet du remplacement d'une partie du lactose par quatre produits amylicés différant par l'intensité de l'hydrolyse appliquée dans le traitement de l'amidon (dextrose, maltodextrine, sirop de glucose et amidon) sur les cinétiques post-prandiales des glucides sanguins. L'hypothèse de travail est que la diminution de l'hydrolyse entraînerait un ralentissement de l'absorption intestinale des oses. Ainsi, l'association de plusieurs produits amylicés au sein d'un aliment d'allaitement permettrait de limiter l'absorption rapide et massive de glucides après le repas, en prolongeant la durée d'absorption des oses. Au cours du protocole, six veaux d'un poids vif d'environ 200 kg seront placés en cage à métabolisme pendant 19 jours, équipés d'un cathéter implanté dans la veine jugulaire et alimentés avec un aliment d'allaitement contenant 20 % de produits amylicés. Le cinquième jour, les veaux recevront le matin un repas constitué d'aliment d'allaitement sans produit amylicé et des prélèvements sanguins seront effectués par le cathéter en cinétique pour mesurer les concentrations en glucose, galactose, fructose, acides gras libres et beta-hydroxy-butyrates au cours des 7 heures suivant le repas. A partir du neuvième jour et tous les quatre jours, les veaux recevront un repas-test constitué de 90 % d'un aliment d'allaitement sans produit amylicé et de 10 % de l'un des produits amylicés et des prélèvements sanguins seront effectués par le cathéter en cinétique pour mesurer les concentrations en glucose, galactose, fructose, acides gras libres et beta-hydroxy-butyrates au cours des 7 heures suivant le repas. A la fin de l'expérience, les animaux seront euthanasiés. Le nombre de veaux a été fixé dans le respect de la règle des 3R et en se basant sur des études précédentes de la bibliographie. Les résultats permettront de comparer les cinétiques sanguines des oses et des acides gras après le repas en fonction du type de produit amylicé introduit dans l'aliment d'allaitement.

3543. Le dioxyde de carbone expiré par les animaux provient en partie de l'oxydation des nutriments apportés par l'alimentation. Le marquage de certains nutriments à l'aide de l'isotope stable du carbone <sup>13</sup>C permet de quantifier l'oxydation de ces nutriments au travers de la mesure de la quantité de dioxyde de carbone expirée et présentant un marquage. Cette quantification nécessite de mesurer d'une part la production de dioxyde de carbone et d'autre part le niveau de marquage au cours d'une période donnée. Les mesures « en continu » sont rarement réalisées car elles nécessitent un équipement spécifique (analyseur de gaz en continu) ; elles permettent cependant de relier les réactions d'oxydation à des événements particuliers de la vie de l'animal tels que son activité physique ou sa consommation d'aliment. Le laboratoire a fait récemment l'acquisition d'un analyseur permettant de mesurer « en continu » la production de dioxyde de carbone marqué chez des animaux placés dans une chambre respiratoire. L'objectif du projet est de mettre au point les protocoles de mesure pour cet analyseur. Le projet se déroulera en deux étapes avec trois porcelets qui seront implantés avec deux cathéters dans les veines jugulaires gauches et droites :

- Production d'un mélange de gaz étalon permettant la calibration de l'analyseur lors des mesures (un porc)
- Mise au point de la technique de la perfusion de glucose marqué (deux porcs) : comparaison de traceurs et de doses de perfusion

Les mesures consisteront en la mesure du poids vif, de la consommation alimentaire, de l'activité physique, de la consommation de dioxygène et de la production de dioxyde de carbone marqué et non marqué. Les animaux seront euthanasiés à la fin du projet.

Ce projet permettra la mise au point de la mesure en continu de la production de dioxyde de carbone marqué dans le cadre de projets scientifiques pour la quantification du métabolisme des animaux en croissance.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de mettre au point la méthodologie de mesure en continu de la production de  $^{13}\text{CO}_2$ , en utilisant des porcs qui seront la principale espèce-cible de la mise au point. Le nombre d'animaux a été minimisé en considérant les effets de rémanence consécutifs aux perfusions de traceurs

3544. Le diabète est associé à un déficit du processus de genèse vasculaire et à des altérations de l'homéostasie nerveuse. Après une longue période de diabète, il en résulte une insuffisance de perfusion du sang dans les jambes, pouvant aboutir à l'amputation chirurgicale d'orteils, du pied, ou même de la jambe atteinte. La faible efficacité des traitements existant souligne la nécessité d'approfondir la connaissance de cette maladie et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. On sait depuis peu que le développement des nerfs et des vaisseaux est très étroitement lié et obéit aux mêmes mécanismes. En particulier, les sémaphorines et les netrines sont des molécules impliquées dans le développement du système nerveux de l'embryon, et peuvent également participer à la réparation d'anomalies nerveuses chez l'adulte.

Notre hypothèse est qu'il est possible, en agissant sur les voies dépendantes de ces molécules de guidance de restaurer la fonction du nerf dans la jambe du patient diabétique, et en même temps, de favoriser la croissance de nouveaux vaisseaux, permettant de fait le rétablissement d'une perfusion sanguine adéquate. Cette étude est une étape vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour objectif de traiter les neuropathies périphériques (maladies des nerfs des membres inférieurs), d'augmenter le nombre et la qualité des vaisseaux sanguins et d'améliorer la perfusion sanguine dans les membres inférieurs des patients diabétiques.

Le nombre total d'animaux est de 680 (dont 240 sauvages et 440 transgéniques dont 40 Nrp1-Flox, 20 Nrp1-Flox/CDH5-CreERT2, 20 Nrp1-Flox/SM22alpha-CreERT2, 20 Nrp1-Flox/TH-CreERT2, 20 Nrp1-Flox/Wnt1-Cre, 80 Netrine-1 Ko, 40 Netrine-1 Flox, 20 Netrine-1 -Flox/CDH5-CreERT2, 20 Netrine-1 -Flox/SM22alpha-CreERT2, 20 Netrine-1 -Flox/TH-CreERT2, 20 Netrine-1 -Flox/Wnt1-Cre, 40 DCC Flox, 20 DCC Flox/CDH5-CreERT2, 20 DCC Flox /SM22alpha-CreERT2, 20 DCC Flox /TH-CreERT2 et 20 DCC Flox /Wnt1-Cre ).

La réduction du nombre d'animaux a été obtenue par la réalisation des seules expériences indispensables, par l'exploitation maximale des animaux (évaluation de la fonction nerveuse comportementale, de la fonction nerveuse électrophysiologique et mesure du flux nerveux sur les mêmes animaux. De même réalisation de la microangiographie et des analyses histologiques sur les mêmes animaux), limitation à 10 animaux par groupe et absence de redondance entre les groupes. Le raffinement a été obtenu par l'utilisation de nombreuses variétés d'animaux transgéniques permettant d'optimiser les expériences et par la prévention systématique des douleurs grâce à un protocole antalgique précis. Le type de notre étude faisant intervenir les relations entre le système vasculaire et le système nerveux ne permet pas le remplacement des expériences in vivo par des expériences in vitro.

3545. Comprendre comment le cerveau encode, consolide, stocke et restitue nos souvenirs est fondamental en Neurosciences. Ces fonctions reposent sur des circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les axones et les dendrites acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Alors que les axones sont envoyés vers leurs cibles spécifiques, la formation d'une arborisation dendritique de plus en plus complexe autour du neurone permet la croissance des épines dendritiques qui établissent des contacts grâce à des jonctions intercellulaires spécialisés: les synapses.

Il est maintenant connu que les protéines de la Polarité Cellulaire et Planaire (PCP) contrôlent la division asymétrique des cellules, le guidage axonal et la formation des synapses. Vangl2 est la protéine majeure de la PCP exprimée dans le cerveau des mammifères. Nous avons récemment constaté que cette protéine s'accumule dans la région de l'hippocampe, une structure très importante pour l'apprentissage et la mémoire.

Nous soumettons ici l'hypothèse que Vangl2 contrôle le développement des circuits de neurones de l'hippocampe au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au remodelage synaptique à la base des processus d'apprentissage et de mémorisation. Nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques pour ce projet et nous avons estimé le nombre total d'animaux à 420 souris. Afin d'utiliser le nombre minimal d'animaux, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour plusieurs tests et évaluations comportementale après chirurgie. Néanmoins pour garantir la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 15 animaux par groupe génotype est nécessaire pour l'étude comportementale et qu'un nombre minimum de 5 souris par génotype est nécessaire pour l'étude histochimique

3546. Chez l'Homme, il a été montré dans différentes études épidémiologiques, qu'il existe une forte corrélation entre le surpoids pendant l'enfance et l'obésité à l'âge adulte. Bien que le poids de naissance ainsi que l'indice de masse corporelle de la mère soient des facteurs de risques de l'obésité, il a été montré que la prise de poids pendant la petite enfance en fonction du poids de naissance, permet de prédire l'apparition de l'obésité à l'âge adulte.

Récemment, une étude rétrospective chez des chats de 8,5 ans, a montré qu'une prise de poids (kg/mois) importante au cours de la croissance ainsi que le poids de fin de croissance étaient des facteurs de risque de l'apparition de surpoids à l'âge adulte.

Les objectifs généraux de ce projet sont d'étudier les causes de la prise de poids rapide pendant la croissance afin (i) d'identifier précocement les animaux à risque, (ii) d'individualiser le besoin de chaque animal afin de prévenir de développement du tissu adipeux et (iii) d'orienter la recherche de solutions nutritionnelles destinées à réduire le risque chez les animaux prédisposés.

Aussi, les procédures auront-elles pour but d'étudier la prédisposition à l'adipogenèse, la dépense énergétique, la vitesse de prise de poids, la consommation alimentaire et le microbiote intestinal

Afin de poursuivre ces objectifs, nous sommes susceptibles de mettre en place de manière récurrente, sur les chiens et chats de notre animalerie, six procédures.

1. Détermination de la composition corporelle par dilution d'eau deutérée (2H2O).
2. Détermination de la dépense énergétique au repos par la méthode des échanges respiratoires.
3. Détermination de la dépense énergétique totale par la méthode de l'eau doublement marquée. (2H218O).
4. Cinétique postprandiale d'hormones impliquées dans la prise alimentaire.
5. Prises de sang régulières (suivi hormonal et suivi de l'état inflammatoire).
6. Détermination de la digestibilité d'aliments industriels ou ménagers.

Ce projet concernerait 26 chiens et 26 chats (nombre déterminés par la puissance du test d'une différence dans la perspective où l'on constituera deux lots sur la base de leur composition corporelle quand ils auront obtenu l'âge adulte). Les animaux seront suivis de la naissance à l'âge de deux ans. Nous aurons aussi les données concernant leurs parents ainsi que les périodes de gestation. Il s'agit des espèces cibles et toutes les procédures envisagées devraient être classées « légères », conformément à l'annexe de l'arrêté relatif à l'autorisation de projet, et ne devraient en rien nuire à l'état de santé ni au bien-être des animaux.

3547. Les Norovirus sont maintenant reconnus comme la cause principale de gastroentérites non-bactériennes aiguës, à la fois chez les enfants et les adultes. Ces gastroentérites affectent mondialement des millions de personnes. L'identification rapide des Norovirus est essentielle pour mettre en place des mesures de prévention qui permettront de réduire la propagation de l'épidémie. La méthode standard pour la détection des Norovirus est la PCR en temps réel, mais cette technique est longue et nécessite des équipements lourds que seuls des laboratoires spécialisés possèdent.

Pour toutes ces raisons nous désirons développer un test immuno-chromatographique permettant une détection rapide des Norovirus dans les selles. Ce test, basé sur la réaction anticorps-antigène, nécessite de disposer d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux très sensibles.

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

Il n'existe pas actuellement d'anticorps commercialement disponibles répondant à nos besoins.

L'immunisation d'animaux permettra d'obtenir un immun sérum qui, une fois purifié, fournira les anticorps polyclonaux qui seront utilisés dans le test.

Le choix des animaux, le nombre d'animaux par série, les immunogènes et le protocole ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injections et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible.

Il est prévu pour notre projet d'immuniser plusieurs séries de 3 ou 5 lapins.

Le nombre total de lapins immunisés sera le plus faible possible pour développer les anticorps dont nous avons besoin, en aucun cas, il ne sera supérieur à 20.

La stabulation des animaux sera réalisée dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées au bien-être des animaux (ambiance musicale...)

3548. Le projet proposé s'inscrit dans les problématiques de recherche actuelles portant sur les adaptations morpho-fonctionnelles et sur la caractérisation des répertoires locomoteurs des primates non-humains. Il consiste en l'élaboration d'un protocole expérimental d'étude de la mise en place du répertoire locomoteur du babouin olive qui se veut intégratif : il croise des données comportementales, anatomiques, et biomécaniques issues d'observations individuelles longitudinales. Parce que les premiers stades locomoteurs sont déterminants dans la mise en place du répertoire de l'adulte, le protocole s'intéresse à une période précoce du développement locomoteur (de 4 à 20 mois).

Le babouin olive est choisi car il fait partie des catarrhiniens, groupes comprenant les hominoïdes et les cercopithécoïdes qui présentent des tendances ontogénétiques locomotrices communes telles qu'une diminution du comportement bipède. Nos études transversales précédentes montrent que le jeune babouin possède un répertoire initial varié, devenant au fur et à mesure principalement spécialisé pour la quadrupédie ; les données biomécaniques vont dans le sens de cette spécialisation.

L'étude que nous proposons est unique à ce jour dans le sens qu'elle est intégrative à un niveau individuel et dans une perspective longitudinale à court terme. Elle vise un niveau de précision élevée nécessitant des observations croisées fréquentes et régulières afin de permettre de mieux comprendre l'intrication des mécanismes morphologiques et locomoteurs liés à la mise en place du répertoire adulte.

Ce travail portera sur 7 babouins immatures vivants en captivité au sein de leur groupe social. Leur habitat est composé d'enrichissements variés permettant un développement morphologique et locomoteur normal. Plusieurs suivis sont envisagés dont un suivi morphologique non-invasif entraînant la capture et la mesure de ces individus sous anesthésie générale. Le protocole est non-douloureux et aucune perte, ni aucun dommage ne sont attendus durant toute la période de l'étude.

3549. Le protocole a pour but de faire explorer par les étudiants la régulation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque par les récepteurs adrénérgiques, ainsi que la modulation de ces paramètres hémodynamiques par un bêta-bloquant, le propranolol.

Environ 30 rats sont utilisés par an (1 rat pour 2 ou 3 étudiants afin de limiter le nombre d'animaux). Les rats sont hébergés dans des cages par groupe de 2 ou 3 dans un environnement dont la température et l'hygrométrie sont surveillées quotidiennement. Les milieux sont enrichis avec des tunnels adaptés au comportement des rats et la nourriture et l'eau sont disponibles à volonté.

Le rat est anesthésié par les enseignants avant toute manipulation par les étudiants. Les moyens mis en œuvre pour remédier à la souffrance sont une association d'analgésique avec l'anesthésique. Les signes cliniques de souffrance sont surveillés en permanence et notamment les signes de réveil. Si l'animal n'est pas en souffrance lorsqu'il montre des signes de réveil, il lui sera injecté une dose supplémentaire d'anesthésique. Si l'animal montre des signes de souffrance cardiaque ou respiratoire, il est rapidement euthanasié par surdose d'anesthésique. En fin de séance d'enseignement, l'animal est euthanasié par surdose d'anesthésique.

3550. Les thromboses veineuses sont des pathologies invalidantes, pouvant être mortelles. Elles sont la troisième cause de mortalité d'origine cardiovasculaire après l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral (Mackmann Nature 2008). On estime à 300 000 le nombre annuel de nouveaux cas déclarés, entraînant la mort d'environ 20 000 patients. L'incidence dans la population adulte est de 1 cas pour 1 000 environ, mais peut atteindre 3 pour 1 000 dans les populations âgées de plus de 70 ans (Dossiers d'information de l'Inserm).

Ces thromboses sont soignées à l'aide d'anticoagulants comme les antivitamines K (préviscan) ou les héparines qui visent à empêcher la formation des mailles de fibrine qui structurent le thrombus. Bien qu'étudiés depuis 150 ans (Virchow 1856), les mécanismes qui initient ces pathologies ne sont pas encore bien connus. Des découvertes récentes chez la souris ont mis en évidence un rôle central des cellules sanguines comme pourvoyeur du facteur tissulaire à l'origine des mécanismes de la coagulation. Elles ont aussi relevé un rôle prédominant des plaquettes sanguines connues jusque-là pour avoir un rôle majeur dans les thromboses artérielles mais pas dans les thromboses veineuses. Nous nous proposons d'étudier le rôle des plaquettes sanguines dans la formation des thromboses veineuses en utilisant un modèle de thrombose développé chez la souris. Nous étudierons dans un premier temps l'effet des médicaments anti plaquettaires déjà prescrits dans la prévention des thromboses artérielles. Comme les mécanismes d'action de ces médicaments sont bien connus, les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le rôle des plaquettes dans la formation des thromboses veineuses. Dans un deuxième temps, nous souhaitons déterminer si les récepteurs d'adhésion et d'activation impliqués dans les étapes précoces des thromboses artérielles jouent également un rôle dans l'initiation des thromboses veineuses. Cette étude pourrait aboutir à l'identification de nouvelles thérapies dirigées contre la thrombose veineuse.

Une attention particulière sera portée à la réduction du nombre d'animaux utilisés en remplaçant des tests d'agrégation qui servent à évaluer des fonctions plaquettaires et qui nécessitent 1 ml de sang, soit le sacrifice d'une souris, par des tests de cytométrie en flux qui nécessitent seulement 10 µl. Ainsi nous pourrions réaliser des prélèvements itératifs sur le même animal ce qui permettra une diminution du nombre d'animaux utilisés. D'autre part les conditions chirurgicales du modèle de thrombose seront raffinées en traitant en pré et post opératoire par un analgésique pour limiter la douleur des animaux. L'étude des médicaments antiplaquettaires nécessitera l'utilisation de 112 souris. L'étude des souris transgéniques pour les récepteurs d'adhésion plaquettaire nécessitera l'utilisation de 120 souris. Soit pour l'ensemble de cette étude nous utiliserons 232 souris.

3551. Les objectifs de ce projet seront d'évaluer la tolérance et l'efficacité de la transfection, par la dernière génération de vecteurs synthétiques (lipophosphoramides et bloc copolymère), du gène codant la protéine majeure de la néo angiogenèse (VEGFA - Vascular Endothelial Growth Factor).

Peu d'études ont évalué l'intérêt de l'utilisation de vecteur non-viraux dans la cardiopathie ischémique, malgré des résultats prometteurs tant à la phase aiguë que chronique. Ces vecteurs non-viraux présentent de nombreux avantages par rapport aux vecteurs viraux (facilité de production, absence d'effets secondaires, absence d'insertion génomique et de risque oncogénique, innocuité de leur ré-administration). Il s'agit donc probablement d'une voie thérapeutique d'avenir.

Notre étude portera sur un échantillon de 80 rats (Sprague-Dawley). Toutes nos expérimentations seront menées après anesthésie afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Cette étude fait suite à une série d'expérimentations in vitro permettant de sélectionner les meilleurs vecteurs de transfection et donc de diminuer le nombre d'animaux nécessaire pour l'évaluation de la tolérance. Nous utiliserons l'échocardiographie et la bioluminescence in vivo afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires pour l'évaluation de l'efficacité de ces vecteurs.

3552. Malgré l'existence de nombreux médicaments, l'hypertension artérielle (HTA) reste difficile à contrôler. De nombreux patients nécessitent 2 ou même 3 médicaments pour contrôler leur pression artérielle (PA). 10% des patients hypertendus sont résistants à des traitements incluant au moins 3 médicaments antihypertenseurs dont un diurétique. Les agents antihypertenseurs actuels sont également moins efficaces chez les patients d'origine africaine ou ceux atteints de diabète ou d'insuffisance rénale. Par conséquent, il est nécessaire de développer de nouvelles classes d'agents antihypertenseurs avec des mécanismes d'action originaux pour améliorer le contrôle de la PA et les risques cardiovasculaires associés. Plusieurs travaux expérimentaux montrent que l'inhibition du système rénine-angiotensine (SRA) cérébral, en particulier l'aminopeptidase A (APA), l'enzyme qui génère le peptide effecteur du SRA, l'angiotensine III (AngIII), pourrait

constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement de l'HTA. L'objectif global du projet vise à démontrer l'intérêt thérapeutique d'utiliser des inhibiteurs de l'APA pour traiter l'HTA en évaluant l'efficacité du RB150, un inhibiteur spécifique et sélectif de l'APA, après administration aiguë et chronique par voie orale dans des modèles précliniques expérimentaux d'hypertension et en évaluant l'innocuité, la tolérance, la pharmacocinétique, et les propriétés pharmacodynamiques du produit chez le rongeur.

Afin de garantir le bien-être des animaux et de respecter la règle des 3R, nos expériences sont menées à minima dans le but d'obtenir des résultats reproductibles avec un minimum d'animaux utilisés par groupe. Les animaux sont placés dans un milieu enrichi et font l'objet d'une attention accrue afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

Ces tests pharmacologiques s'inscrivent dans le cadre d'une phase préclinique d'un nouveau traitement de l'hypertension chez l'homme, il est par conséquent indispensable de mener ces études sur un modèle reproduisant la pathologie de manière fidèle au niveau d'un organisme entier. Le recours à des méthodes alternatives, de type culture cellulaire, se révélerait insuffisant dans une phase préclinique puisqu'il ne permet pas de travailler sur un organisme entier

L'estimation du nombre d'animaux sur 5 ans est de 2880 rats: nous envisageons de réaliser 4 procédures expérimentales de 576 rats par an (sur 5 ans : Rats DOCA-sel: 840 - Rats SHR : 840 - Rats WKY : 600 - Rats Sham : 600). En fonction des résultats, ce nombre pourra être réduit.

3553. PROJET 1 : Etude des propriétés vasoactives de l'apéline et de son rôle dans le maintien de l'équilibre hydrique au niveau rénal. Mise en évidence de la présence d'un sous-type de récepteur de la vasopressine (récepteur V1b) dans le canal collecteur situé dans la médulla interne (IMCD)

L'apéline est un peptide qui possède des propriétés vasorelaxantes. Nous avons montré que l'apéline était capable d'inverser totalement l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II et ceci à l'aide de mesures d'augmentation de calcium intracellulaire et de variations de diamètre sur des artérioles glomérulaires microdisséquées. Un des objectifs de notre équipe étant de développer des agonistes et des antagonistes de l'apéline résistants à la dégradation enzymatique. Nous utiliserons les expériences citées ci-dessus pour évaluer nos molécules.

L'apéline est un peptide qui possède des propriétés diurétiques. Nous avons montré que les

ARN messagers du récepteur de l'apéline étaient exprimés dans les canaux collecteurs selon un gradient cortico-médullaire. Les canaux collecteurs sont des segments très importants dans le rein pour l'action de la vasopressine (AVP) qui régule entre autre la perméabilité à l'eau via le récepteur V2 (V2-R) de l'AVP. Contrairement à l'apéline, l'AVP est une hormone antidiurétique, c'est la raison pour laquelle nous étudions les interactions entre apéline et vasopressine dans la régulation de la diurèse, processus extrêmement important dans le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme.

Mise en évidence de la présence d'un sous-type de récepteur de la vasopressine (récepteur V1b) dans le canal collecteur situé dans la médulla interne (IMCD). Ce segment exprime à la fois des récepteurs de l'AVP de type V2 et V1b. Les récepteurs de type V1b ont été très peu étudiés jusqu'à présent. C'est la raison pour laquelle dans cette étude nous envisageons de caractériser ce récepteur pharmacologiquement, d'étudier les voies de signalisation activées lors de la stimulation de ce récepteur, ainsi que son rôle physiologique potentiel dans l'IMCD de rein de rat.

Nous envisageons d'utiliser pour ce projet: 350 rats mâles Sprague-Dawley.

PROJET 2 : L'apéline est un peptide qui possède des propriétés vasorelaxantes et diurétiques. Sachant que la demi-vie de l'apéline dans le sang est de l'ordre de la minute et que son effet hypotenseur disparaît au bout de 2 minutes, il est nécessaire d'étudier de nouveaux dérivés de l'apéline métaboliquement stables. Ce projet a pour l'objectif de caractériser les effets de ces composés injectés par voie intraveineuse sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez le rat normotendu ou hypertendu anesthésié.

Nous envisageons d'utiliser pour ce projet 700 rats mâles Wistar ou Spontanément Hypertendus (SHR).

PROJET 3 : Ce projet nous permet d'étudier plus avant le rôle de l'apéline dans la régulation de l'équilibre hydrique et de trouver des analogues de l'apéline métaboliquement stables permettant de maintenir cet équilibre et de s'opposer aux rétentions hydriques.

Il porte d'une part sur l'étude de la demi-vie de composés peptidiques ou non-peptidiques après injection par voie intraveineuse dans la circulation sanguine chez la souris Swiss et d'autre part, sur les effets de ces composés au cours de la déshydratation (24h), sur les taux d'apéline et de vasopressine hypothalamiques et plasmatiques après injection par voie intracérébro-ventriculaire chez la souris.

Nous étudierons également le rôle de l'enzyme de conversion de type 2 (ACE2) dans le métabolisme de l'apéline, en parallèle avec celui de l'angiotensine II, in vivo dans le cerveau et dans la circulation sanguine à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme injectés par voie intraveineuse chez la souris.

Nous envisageons d'utiliser pour ce projet: 2400 souris mâles Swiss

Nos expériences sont menées à minima dans le but d'obtenir des résultats reproductibles avec un minimum d'animaux utilisés par groupe. Les animaux sont placés dans un milieu enrichi et font l'objet d'une attention accrue afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

Dans le but de développer un outil thérapeutique, ces études seraient menées sur un modèle physiologique intégré. En effet, les méthodes alternatives, de type culture cellulaire, se révéleraient insuffisantes puisqu'elles ne permettent pas de travailler sur un organisme entier.

3554. La thérapie génique constitue une approche prometteuse pour traiter les maladies génétiques monogéniques. Elle permet l'apport de la copie fonctionnelle d'un gène dans un tissu déficient pour ce même gène. Cela s'effectue le plus

couramment par le biais de vecteurs viraux recombinants qui vont véhiculer le transgène, en ciblant un tissu donné et permettre ainsi l'expression d'une protéine transgénique. Parmi les vecteurs viraux recombinants, les AAV (Adeno-associated Virus) sont parmi les vecteurs viraux les plus souvent utilisés en clinique car bien qu'ils infectent naturellement l'homme ils ne sont pas pathogènes. Aussi, ils sont capables de transduire différents types de tissus en fonction du sérotype utilisé.

Cependant, la thérapie génique se heurte à une limite majeure qu'est la réponse immunitaire vis-à-vis de la capsid virale ainsi que vis-à-vis de la protéine transgénique. En effet, bien que la protéine transgénique corresponde parfois à une protéine exprimée à l'état physiologique dans la population humaine, sa réexpression chez les patients déficients peut déclencher une réponse immunitaire contre ce néo-antigène. L'usage de molécules immunosuppressives est couramment utilisé en clinique pour inhiber ces réponses. Cependant, ces drogues induisent un effet systémique, rendant les patients vulnérables aux infections et aux risques de cancer. Il apparaît ainsi nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies d'inhibition de la réponse immunitaire ciblée contre le vecteur viral ainsi que de la protéine transgénique.

Dans ce projet, nous proposons deux approches différentes d'inhibition de la réponse dirigée contre la protéine transgénique :

- i) une stratégie de tolérisation orale vis-à-vis la protéine transgénique. Il est en effet connu qu'un antigène ingéré par voie orale, tel qu'un antigène alimentaire, n'entraîne pas de réponse immunitaire. Nous souhaitons mettre en place un protocole de tolérisation par ingestion de la protéine transgénique modèle ou d'un probiotiques produisant cette protéine. Ceci aura pour objectif «d'éduquer » le système immunitaire et de le rendre tolérant vis-à-vis de cette protéine avant même l'injection des vecteurs thérapeutiques.

-ii) Une stratégie basée sur l'utilisation de protéines immunorégulatrices ciblant les voies naturelles de contrôle des réponses immunitaires. Ces protéines immunorégulatrices seront soit injectées sous leur formes recombinantes par voie systémique soit produites in situ après injections de vecteurs AAV codant pour ces protéines. Dans ce cas de figure, les souris seront co-injectées avec le vecteurs de thérapie génique codant pour la protéine transgénique modèle ainsi qu'avec le vecteur codant pour la protéine inhibitrice de la réponse immunitaire. Cette stratégie devrait permettre d'induire in vivo un état de tolérance à la protéine transgénique codée par le vecteur de thérapie génique.

Au maximum, l'ensemble des expériences incluses dans ce projet pourront nécessiter jusqu'à 1050 souris. Ce nombre est justifié par le nombre de procédures expérimentales impliquées (5 procédures différentes), par le nombre de groupe expérimentaux (de 3 à 7 groupes selon les expériences), par le nombre d'animaux par groupe (7 souris par groupe) et par la répétition des expériences pour s'assurer de leur reproductibilité. Le nombre d'animaux par groupe et la répétition des expériences permettront de s'assurer de la validité statistique des résultats obtenus et de pallier aux fluctuations expérimentales inhérentes à la variabilité des réponses, notamment immunologiques, entre les animaux d'un même groupe expérimental. Il est à noter cependant que ce nombre de 1050 animaux constitue simplement une estimation du nombre maximal d'animaux nécessaires mais que le nombre réel sera très vraisemblablement beaucoup plus bas. En effet, en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), les expériences ne seront reproduites 3 fois que dans le cas où le résultat de la première expérience valide l'hypothèse de travail et nécessite dans ce cas d'être confirmé (en accord avec les exigences scientifique de reproductibilité). D'autre part, plusieurs traitements immunorégulateurs sont envisagés dans ce programme mais seul le meilleur protocole de tolérisation orale et le meilleur protocole de tolérisation basée sur l'administration d'une protéine immunomodulatrice seront testés de manière approfondie dans les phases finales du projet afin de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaires en conformité avec l'exigence de réduction et de raffinement. Enfin, dans le cas des protéines immunorégulatrices, les tests in vitro mis en place au laboratoire permettront de s'assurer de l'activité biologique de ces protéines avant toute expérimentation in vivo afin là aussi de réduire le nombre d'animaux nécessaire en conformité avec l'exigence de remplacement.

Au total, ces stratégies devraient permettre de moduler les réponses immunes dirigées contre la protéine thérapeutique soit par induction d'une tolérance spécifique à cette protéine par l'approche de la tolérisation orale, soit par une inhibition des effecteurs immunitaires par la stratégie reposant sur l'utilisation de molécules immunomodulatrices.

3555. Il existe différents types de cellules souches (CS) : les CS embryonnaires (cellules ES), les CS induites expérimentalement (cellules iPS) et les CS adultes, également dénommées somatiques pour les différencier des cellules ES. Ce projet concerne uniquement les cellules souches adultes (CSA) qui sont définies par leur propriété unique de s'auto-renouveler et de persister tout au long de la vie d'un individu, tout en étant capables de se différencier dans tous les types cellulaires d'un tissu donné ; elles assurent ainsi le renouvellement des cellules sénescents ou bien endommagées à la suite d'un stress. Les plus connues de ces CSA sont les CS hématopoïétiques résidant dans la moelle osseuse et générant la totalité des cellules sanguines. Mais il existe des CSA dans la plupart des tissus comme la peau, la prostate, ....

Du fait de leur capacité élevée de régénération, ces CSA offrent des perspectives thérapeutiques, ouvrant la voie à une nouvelle médecine dite régénérative. Elles présentent aussi un énorme intérêt dans l'étude des cancers puisqu'elles apparaissent aujourd'hui comme la cible la plus probable des mutations initiatrices de la transformation maligne, et comme jouant un rôle central dans le maintien de la tumeur, dans son pouvoir métastatique, et surtout dans la résistance aux traitements anticancéreux. On parle alors de cellules souches cancéreuses.

Le projet présenté ici concerne l'isolement et la caractérisation des CS de la prostate, normales ou tumorales, en utilisant comme modèles, des lignées de souris transgéniques. Nous avons mis en évidence plusieurs marqueurs potentiels des CS prostatiques qui devraient permettre la purification des CS normales à partir de prostatites normales, ou bien des CS cancéreuses à partir de tumeurs se développant dans un modèle de souris exprimant un oncogène de façon spécifique dans les épithélia prostatiques et mammaires. Etant donné que la caractéristique principale d'une CS est de pouvoir générer après greffe un tissu complet dans le cas d'une CS normale, ou bien une tumeur reproduisant l'hétérogénéité de la tumeur initiale

dans le cas d'une CS cancéreuse, le projet décrit dans cette demande concerne ces études in vivo qui sont donc essentielles à la démonstration de la nature de CS. Nous estimons l'implication d'environ 240 souris par an, soit 1200 souris sur les 5 années du projet décrit dans cette demande.

Tout a été fait dans ce projet pour satisfaire au mieux à la règle des 3R : Réduction : le nombre d'animaux a été estimé au plus juste en se basant sur l'expertise de l'investigateur principal qui a initié ce projet aux USA sous le contrôle d'un comité d'éthique (IACUC), et en utilisant des modèles animaux déjà décrits dans la littérature, ce qui permet d'estimer au plus juste le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir les résultats attendus. Raffinement : ce projet sera conduit dans des conditions d'élevage optimales : en animalerie SPF, en portoirs ventilés, enrichissement de l'environnement des souris, suivi sanitaire permanent par les responsables de l'animalerie ; de plus, dans le cas où il existe un phénotype dommageable (développement de tumeurs par les souris C3(1) TAG), nous connaissons la partie du corps où se développera la tumeur, ainsi que le moment exact du début de développement des tumeurs, et son évolution au cours du temps ; nous améliorerons le suivi des animaux pour décider l'interruption de l'expérience en cas de suspicion de souffrance de l'animal. Malheureusement, dans le cas précis des cellules souches, il n'est pas possible de Remplacer ces modèles animaux. La souris est le modèle de référence pour étudier les cellules souches normales ou cancéreuses de la prostate ; mais un point important est que l'utilisation ici de souris transgéniques déjà étudiées par la communauté scientifique permet une optimisation des deux autres « R » et permet une meilleure approche expérimentale.

L'objectif final de ce projet est de caractériser au niveau moléculaire ces CS, ce qui permettra une meilleure connaissance des voies de signalisation et des marqueurs qui leur sont spécifiques, dévoilant ainsi des cibles potentielles pour des traitements plus efficaces du cancer de la prostate.

3556. L'anti PD-1 a démontré son efficacité clinique dans plusieurs pathologies oncologiques tels que le mélanome, le cancer pulmonaire non à petites cellules ou encore le cancer rénal. Néanmoins, ces thérapies ont un coût important et ne sont efficaces que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver des marqueurs prédictifs de réponse et les mécanismes cellulaires sous-jacents afin de proposer ultérieurement de nouvelles combinaisons thérapeutiques.

Nous savons que cet anticorps monoclonal, de par sa cible, permet une réinduction de la réponse immune qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses mais nous ignorons encore les voies cellulaires et moléculaires essentielles pour son efficacité thérapeutique.

Dans cet objectif, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de cet anticorps thérapeutique afin d'accroître son efficacité.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années et nécessitera plusieurs expérimentateurs. Etant donné la dépendance des premiers résultats pour envisager la suite du projet à long terme, le projet va être décrit pour 12 mois et nécessitera 1150 souris. Il sera resoumis avec l'avancement des travaux et la suite envisagée. Ce nombre important d'animaux se justifie par la diversité des modèles de tumeurs et les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

3557. Le développement d'une stratégie vaccinale dans le traitement de certains cancers semble être une approche thérapeutique prometteuse. Cependant, dans le contexte actuel, aucun vaccin n'a prouvé son efficacité en clinique. Partant de ce constat, il semble nécessaire de définir de nouveaux antigènes pouvant être mieux adaptés à une utilisation thérapeutique. Pour cette raison, nous avons précédemment mis en évidence que les Pioneer translation products (PTPs) et les exosomes possèdent les propriétés nécessaires pour être des substrats peptidiques antigéniques et pourraient donc agir comme des antigènes pour le développement d'une stratégie vaccinale.

Dans cette optique, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes de production des PTPs dans un contexte tumoral ainsi que leur utilisation pour le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les modèles de tumeur disponibles ont été développés chez la souris et les modèles de souris transgéniques sont indispensables à l'étude de l'immunité anti-tumorale après traitement.

1100 souris seront nécessaires à la mise en œuvre de ce projet. Ce nombre important d'animaux se justifie par la diversité des modèles de cancers, les différentes combinaisons de PTPs et exosomes thérapeutiques, l'étude des réponses immunitaires liées à leur utilisation, ainsi que les différentes voies de signalisation mises en jeu.

Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement ; d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux.

3558. Notre équipe de recherche est spécialisée en oncopharmacologie. Le projet s'inscrit dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans le glioblastome en combinant des criblages à haut débit de drogues déjà connues dans le traitement d'autres pathologies et de siRNA. Le glioblastome est une tumeur cérébrale dont le pronostic est sombre, qui est

résistante à la plupart des traitements actuels et qui peut rarement être traitée seulement par la chirurgie. Il est urgent de rechercher de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces pour les patients atteints du glioblastome. Notre approche est basée sur l'utilisation de molécules thérapeutiques déjà validées par les agences sanitaires dans d'autres indications thérapeutiques (drug repositionning). Cette alternative au développement de nouveaux médicaments présente l'avantage d'un gain de temps et d'argent puisque les critères d'utilisation chez l'homme sont déjà connus (pharmacocinétique, toxicité). Le premier objectif du projet est de trouver rapidement des médicaments capables de renforcer les traitements actuels du glioblastome. Dans un premier temps, une banque de 3600 composés sera criblée sur plusieurs lignées cellulaires représentatives de la pathologie. Les molécules les plus actives (hits) (entre 3 et 5) seront sélectionnées en fonction de leur spécificité et de leur tolérance. Ces hits seront alors validés in vivo sur des souris porteuses de tumeur humaine (xénogreffe) ou murine (tumeur syngénique). L'activité antitumorale de chaque hit sera évaluée, seule et en combinaison avec les traitements de référence. Les cellules tumorales seront implantées de façon orthotopique, c'est-à-dire dans le cerveau des animaux afin de mimer au mieux la tumeur humaine. Cette étape de validation in vivo est indispensable avant toute utilisation clinique. Ces modèles sont largement décrits dans la littérature ; Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine.

En parallèle, nous répondrons au 2ème objectif du projet en étudiant les voies de signalisation modulées par les hits afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou biomarqueurs. Nous aurons recours pour cela à une technique de criblage à haut débit basée sur des siRNA puis à des études de génomique fonctionnelle.

Les trois protocoles de traitement qui sont décrits ci-dessous seront réalisés sur deux modèles différents de souris : souris Nude athymiques recevant une xénogreffe (tumeur humaine de glioblastome) et souris C57Bl6 recevant une greffe syngénique de gliome GL261.

1) Huit groupes seront d'abord constitués pour évaluer le potentiel thérapeutique du hit le plus prometteur. Il s'agira de tester une triple association de traitements : les animaux seront traités avec le hit (ou son solvant), en association avec le temozolomide (ou son solvant) et un agent de thérapie ciblée (anti-EGFR n°1 ou 2) (ou son solvant), sélectionné après validation in vitro.

2) Quatre groupes seront ensuite constitués pour 3 hits différents, pour tester les effets d'une double association : les souris seront traitées avec un hit (ou son solvant) et selon les résultats in vitro soit en association avec le temozolomide (ou son solvant) soit avec un agent de thérapie ciblée (ou son solvant). Donc pour les 3 hits : 4 groupes x 3 = 12 groupes.

3) Quatre groupes seront ensuite constitués pour un hit sélectionné, pour tester les effets d'une double association : les souris seront traitées avec un hit (ou son solvant) combiné ou non à la radiothérapie.

Pour l'analyse des volumes tumoraux, un minimum d'animaux (n=3) nécessaire aux conclusions statistiques sera euthanasié à trois et quatre temps différents (respectivement pour les modèles syngéniques et xénogreffes) dans les différents groupes (soit au total 504 animaux). Les cerveaux seront disséqués et le volume tumoral déterminé par coloration histologique et analyses morphométriques.

En parallèle, l'évolution du poids des animaux des différents groupes sera analysée pour les deux modèles (n=8 par groupe, soit 384 animaux)

Donc, pour les trois protocoles de traitement et pour les deux modèles animaux le nombre total d'animaux s'élève à 504 + 384= 888 souris.

3559. L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque et des troubles du rythme. Trois domaines sont explorés, l'énergétique, les mouvements calciques et les nucléotides cycliques. Le projet vise à la caractérisation des cascades de signalisation intracellulaires impliquées dans le développement de ces pathologies. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire. Des rats sont utilisés afin de comprendre l'implication de ces voies de signalisation dans la fonction cardiaque et vasculaire. L'insuffisance cardiaque est induite en respectant les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont sacrifiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les trois domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés (principalement muscles squelettiques, cœur et vaisseaux). Un total de 250 rats par an soit 1250 rats pour 5 ans est utilisé.

3560. Les maladies inflammatoires des voies respiratoires profondes sont une cause majeure de baisse de performances chez les chevaux athlètes : plus de 60% des chevaux évalués pour contre-performance en seraient atteints. Malgré l'importance de ces affections, les options thérapeutiques restent encore très limitées et se résument en l'administration d'anti-inflammatoires, approche uniquement symptomatique présentant des risques d'effets secondaires. Outre le coût de ce traitement non ciblé et les frais associés aux modifications environnementales nécessaires pour limiter les signes cliniques, les conséquences économiques de ces affections sont majeures du fait des perturbations des programmes d'entraînement et de compétition (mise au repos, respect du « délai dopage » lié aux substances interdites en compétition, ...). Dans le cas de maladies contagieuses, l'impact sur la filière est encore plus marqué (mise en quarantaine des chevaux atteints, limitation de transport, annulation des regroupements).

Ces inflammations respiratoires peuvent être considérées comme une réponse inadaptée de la première ligne de défense de l'organisme des chevaux : l'immunité innée, aussi appelée non spécifique. Celle-ci comprend un grand nombre d'acteurs dont

des cellules capables de reconnaître des pathogènes par le biais des récepteurs Toll-like (TLR) qui jouent un rôle clé pour engendrer une réponse immunitaire concertée. De nouvelles molécules, ou ligands, agissant spécifiquement sur ces récepteurs ont été développées et constituent des candidats de choix pour moduler la réponse immunitaire.

L'objectif du projet IMOPEQ est de développer une nouvelle thérapie immuno-modulatrice pour lutter contre les affections respiratoires du cheval, basée sur l'administration de ligands des TLR. Des tests *ex vivo*, sur des cellules prélevées sur des chevaux, ont déjà été effectués. L'étape suivante consistera à administrer par voie intramusculaire la molécule la plus prometteuse (CpG) à 8 chevaux trotteurs français, sains, au repos, afin de mesurer ses effets. Les animaux seront étroitement surveillés pendant la semaine suivant l'injection, même si aucune réaction majeure n'est attendue (possibilité de réaction inflammatoire locale au site d'injection et de réaction générale de type hyperthermie, abattement). Si les résultats sont prometteurs, une administration par nébulisation (voie idéale pour le traitement des affections respiratoires), sera ensuite également testée.

3561. Il est maintenant bien admis que la croissance des tumeurs requiert la mise en place d'un réseau vasculaire dédié à l'irrigation du tissu malade. Bien que faisant appel à des mécanismes physiologiques, l'angiogenèse tumorale se produit de manière aberrante. En particulier, les vaisseaux tumoraux ont une morphologie irrégulière et leur étanchéité est perdue. Cette élévation de la perméabilité contribue directement à l'augmentation de la densité vasculaire, à l'inflammation tumorale et à la dissémination métastatique. Notamment, des traitements anti-angiogéniques ont été mis en place dans un certain nombre de cancers. Cependant, les molécules thérapeutiques disponibles ne sont pas toujours efficaces et restent mal tolérées, outre que la rechute et la résistance demeurent encore élevées. Il est donc important de mieux comprendre les processus conduisant à l'angiogenèse tumorale. Des résultats *in vitro* ont permis d'identifier de nouveaux acteurs, impliqués dans l'angiogenèse et/ou dans l'augmentation de la perméabilité. Il est désormais important de déterminer si ces molécules constituent effectivement des cibles permettant de réduire les défauts vasculaires observés dans les tumeurs, et ainsi ralentir la progression tumorale *in vivo*. Les expériences seront réalisées chez la Souris (*Mus musculus*, BALB/C nude) avec un total de 102 animaux. Les résultats obtenus dans le modèle animal devraient permettre d'apporter la preuve de concept que les molécules identifiées *in vitro* pourraient être des cibles thérapeutiques à action anti-angiogénique et/ou anti-perméabilité.

3562. L'identification de stimuli olfactifs attractifs/répulsifs présente un intérêt majeur dans la perspective de luttres contre les rongeurs domestiques. Dans l'objectif de déplacer les rongeurs d'endroits où ils résident vers des endroits dans lesquels des pièges ou appâts seront disposés, nous cherchons à identifier des stimuli odorants pouvant favoriser ces déplacements. Pour ce faire, notre paradigme expérimental consiste à évaluer les modifications comportementales (approches/éloignements) induites par des odeurs placées dans l'environnement familier des animaux (les animaux testés sont familiarisés durant deux jours à l'environnement dans lequel ils seront soumis à l'odeur testée). Des mesures effectuées sur 3 heures consécutives au dépôt de l'odeur nous permettront également d'évaluer les limites de l'effet engendré.

Notre projet s'articule en deux parties. La première s'appuie notamment sur de résultats signalant que les préférences olfactives des souris et des hommes se rejoignent. Notre hypothèse est donc que des perturbations comportementales produites par des odeurs généralement qualifiées d'agréables ou plaisantes conduiront à des perturbations comportementales différentes des souris comparativement à des odeurs généralement qualifiées de désagréables. Trois lots de 3 odeurs agréables/désagréables/intermédiaires sont prévus pour être testés. Les 24 mâles prévus pour cette étude sont les mêmes que ceux utilisés pour une étude précédente.

La seconde partie de l'étude prévue porte sur les réponses comportementales induites par des odeurs sociales. Nous avons sélectionné trois odeurs sociales largement décrites chez la souris domestique. Ces odeurs sociales interviennent dans la communication chimique de ces animaux, notamment dans le cadre de la reproduction. Si l'attractivité de ces substances est relativement connue, les réponses comportementales et émotionnelles qu'elles induisent lorsqu'elles sont déposées dans le milieu familier de l'animal le sont beaucoup moins. Les odeurs sociales testées sont majoritairement décrites comme ayant une action attractive sur les femelles. Nous nous proposons donc de comparer l'attraction de ces 3 substances et les réponses thermiques périphériques d'un lot de huit femelles soumises à ces odeurs (ces réponses thermiques périphériques résultent de l'activation sympathique). Ces huit souris femelles adultes sont issues de l'élevage de souris d'origine sauvage du laboratoire. Elles seront testées pour chacune de ces odeurs dans un ordre randomisé. Les souris mâles pouvant également être affectés par ces odeurs, huit des mâles précédemment utilisés seront à nouveau testés pour leur réponses comportementales et thermiques à ces odeurs.

Les tests envisagés ne peuvent être réalisés sans l'emploi d'animaux. Le nombre d'animaux utilisé est limité à 8 individus par lot expérimental. Ce nombre autorise une validation statistique des effets répulsifs/attractifs des odeurs testées et des fines réponses thermiques d'origine sympathique. Les animaux de chacun des lots sera utilisé pour tester l'effet de différentes odeurs (avec randomisation et stratification pour l'analyse statistique) afin de réduire au maximum le nombre d'animaux à employer. Avant, et après les tests les animaux seront replacés dans leur cage habituelle d'élevage en présence de leurs congénères familiers. Si lors des tests, des signes de stress durable, ou de panique sont relevés, les tests s'interrompent pour ces animaux et seront replacés dans leur cage d'élevage.

3563. Le cancer est la troisième cause de mortalité après les maladies cardio-vasculaires et infectieuses – la deuxième dans les pays développés. Chaque année, environ 4100 nouvelles tumeurs cérébrales primitives sont diagnostiquées, soit 1,3 % de l'ensemble des cancers. Les cancers du cerveau représentent 20 % des cas de cancers pédiatriques, les plus fréquents

après les leucémies. En matière de diagnostic, l'imagerie médicale progresse grâce aux évolutions des techniques et des molécules diagnostiques qui permettent une détection plus précoce et plus fiable des tumeurs, et donc une meilleure prise en charge des patients. La mise au point de nouveaux produits spécifiques qui caractérisent la nature cancéreuse des masses suspectes pourraient aider les médecins à sélectionner les traitements les plus appropriés.

L'enjeu de cette étude est de caractériser en IRM de nouvelles molécules diagnostiques dans un modèle préclinique de tumeur cérébrale chez 10 rats, dans le but de faire progresser le diagnostic précoce des tumeurs cérébrales humaines.

Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'étude portant sur le cerveau, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, aucun modèle alternatif ne permet encore de reproduire en globalité la complexité de cet organe et des interactions entre tissu sain et tissu tumoral.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

3564. La littérature sur l'évolution du langage suggère une incapacité des singes à produire une aussi grande diversité de vocalisations que l'homme. Dans ce projet, nous étudierons la diversité des productions sonores de babouins de guinée (*Papio papio*), afin de décrire l'utilisation spontanée de leur l'espace vocal et de la comparer aux données de la littérature humaine. Ce projet de recherche fondamentale apportera des informations sur l'origine du langage, du primate non-humain à l'homme. Ce projet combinera une approche de modélisation basée sur une prise de données anatomiques, et des enregistrements de productions sonores.

Dans la pratique, ce projet se déroulera en quatre phases.

1 - Anesthésie que 10 babouins d'âge, de sexes différents et de morphologies différentes afin d'obtenir un scan anatomique sagittal de leur tractus vocal (larynx, pharynx et cavités buccales).

2 - Modélisation informatique des productions vocales théoriques estimées selon le modèle articulatoire dit du plombier. Pour une modélisation optimale, ce modèle utilisera comme paramètres d'entrée les valeurs anatomiques obtenues en phase 1.

3- Enregistrement de productions vocales spontanées de babouins de guinée vivant en groupe social dans un enclos de la station de primatologie de Rousset. Ces enregistrements se focaliseront sur les animaux utilisés en phase 1, ou d'autres animaux du groupe ayant un morphotype similaire.

4- Confrontation des données théoriques aux données issues des productions vocales réelles.

Ce projet de recherche vise à mieux connaître les capacités vocales du babouin *Papio papio*. Il requiert donc l'étude d'individus de cette espèce, et ne permet pas le remplacement. Toutefois, en application du principe des 3R, les anesthésies seront réalisées dans les règles de l'art en appliquant un protocole bien contrôlé et non douloureux (raffinement), qui sera appliqué à un nombre minimum de sujets (réduction). Les animaux sont réintégrés dans leur groupe social immédiatement après la phase 1.

3565. Les Poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs, une famille de 17 membres) sont des protéines impliquées dans la maintenance de l'intégrité du génome. PARP1 et PARP2 sont maintenant connus comme des acteurs clés de la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN. Leur inhibition présente un intérêt en thérapie du cancer en potentialisant l'action cytotoxique des agents anti-tumoraux. Les inhibiteurs actuellement en essai clinique sont toutefois peu spécifiques et l'un des objectifs en recherche est de décortiquer les propriétés fonctionnelles des autres membres de cette famille et d'évaluer leur contribution dans la réponse cellulaire aux dommages. Dans cette idée, nous avons récemment entrepris la caractérisation biochimique et fonctionnelle de PARP3 jusque là peu caractérisée. Nous avons identifié un rôle de PARP3 dans la réponse cellulaire spécifiquement des cassures double-brins. Ceci ouvre des perspectives de recherche très attrayantes visant à inhiber spécifiquement PARP3 pour potentialiser l'action cytotoxique d'agents clastogènes générateurs de cassures double-brins. Un tel agent couramment utilisé en thérapie du cancer est l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II. Le projet soumis vise à déterminer et comprendre l'impact de l'absence de PARP3 ou de son inhibition dans la cytotoxicité de l'étoposide en comparaison avec d'autres agents génotoxiques. Nous utiliserons 696 animaux pour la réalisation du projet. Avec ce projet nous espérons définir PARP3 comme une nouvelle cible en thérapie du cancer.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer: Nos modèles de lignées cellulaires dans lesquelles nous déplaçons PARP3 se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés pour l'étude de la tumorigenèse. Les observations actuelles du laboratoire dans ces modèles *in vitro* permettent de proposer PARP3 comme une cible favorisant la cytotoxicité de certains agents anti-tumoraux.

Toutefois, la validation de ces résultats nécessite des approches *in vivo* chez la souris. Bien que efficace, la déplétion de PARP3 dans les modèles cellulaires par les approches technologiques actuelles (siRNA, shRNA) ne permet pas de générer des lignées totalement dépourvues de protéine. L'exploration des propriétés biochimiques de PARP3 devient alors difficile. Le modèle de la souris PARP3<sup>-/-</sup> que nous avons généré au laboratoire permet de générer des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris totalement dépourvus de PARP3. Ce modèle cellulaire établi à partir du modèle animal permettra de décortiquer les propriétés biologiques de PARP3 dans la réponse cellulaire aux cassures double-brins et à plus long terme dans d'autres voies cellulaires.

Réduire: Le nombre minimum d'animaux nécessaire aux approches in vivo et à l'établissement des fibroblastes embryonnaires de souris a été précisément réfléchi. Concernant les xénogreffes dans les souris nude, 9 souris sont nécessaires/condition expérimentale. Chaque souris peut être implantée de deux lignées tumorales en sous-cutanée.

La mise en culture de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) réalisée à partir d'embryons de 13,5 jrs issues de croisements hétérozygotes PARP3+/-, nécessite 30 femelles gestantes. Les cultures primaires peuvent être immortalisées.

Raffiner (critères d'interruption): Les injections sous-cutanées SC de cellules tumorales ne sont pas considérées comme douloureuses. Toutefois, elles seront réalisées sur des animaux anesthésiés pour éviter un stress lié à la manipulation. Les injections intra-péritonéales IP des agents antitumoraux et des anesthésiants sont effectuées sur animaux vigiles. La croissance des tumeurs sous-cutanées n'induit pas de gène particulier à la vie animale. Toutefois, les souris seront étroitement surveillées et pesées. La mise à mort sera effectuée si les signes suivants sont observés : perte de poids supérieure à 20% au cours du protocole, signes manifestes de douleur (animal prostré, ne se toilettant plus, ne se nourrissant plus, déshydraté ou tumeurs nécrosées). Pour la mise en culture des MEFs, les embryons sont sacrifiés par décapitation.

3566. L'esturgeon européen, espèce emblématique de grands fleuves européens comme la Gironde, l'Elbe ou encore le Guadalquivir, est classé en danger critique d'extinction selon les critères de l'UICN. La dernière population est issue du bassin de la Gironde et la dernière reproduction naturelle observée date de 1994. Les effectifs n'ont cessé de décroître malgré la protection réglementaire de l'espèce en 1982 en France et sur son aire marine depuis 1996 par les conventions internationales. Un plan d'action pour la protection et la restauration de l'esturgeon européen a été rédigé sous l'égide de la convention de Berne avec des déclinaisons opérationnelles en France et en Allemagne

Depuis 1994, Irstea a constitué un stock de géniteurs maintenus dans les bassins de la station de St Seurin sur l'Isle et permettant de produire des larves et des juvéniles pour soutenir, par des alevinages réguliers, cette dernière population d'esturgeons européens.

Irstea a entrepris avec des équipes scientifiques partenaires, spécialisées en écotoxicologie, pathologie, génétique, éthologie, de faire le point sur les méthodes employées actuellement pour soutenir cette population, comprenant l'élevage des géniteurs et des juvéniles ainsi que les conditions de déversement dans le milieu naturel.

Le projet présenté a pour objectif de déterminer le niveau de contamination des sites de lâcher déjà choisis, et de savoir s'ils peuvent permettre un taux de survie suffisant des jeunes *A. sturio*, ou si au contraire ces sites se montrent tout à fait inappropriés et doivent être changés afin de garantir les meilleures chances de réintroduction de cette espèce dans le système fluvio-estuarien de la Garonne-Dordogne. Une étude préliminaire a mis en évidence des risques de malformations d'embryons de medaka (*Oryzias latipes*) sur certaines des stations de déversements des jeunes esturgeons européens.

L'expérimentation portera sur des jeunes *A. sturio* nés à partir de géniteurs élevés dans notre station expérimentale, et placés dans trois structures en circuit fermé. Chacune recevra de l'eau et des sédiments d'une station de la Garonne, de la Dordogne et du sable de Fontainebleau avec de l'eau de forage pour servir de témoin. Dans chaque structure expérimentale, la température de l'eau et le rythme d'éclairement sont identiques à ceux du milieu naturel et les poissons sont nourris quotidiennement. Après un séjour d'un mois dans cette structure, les poissons seront mis ensuite en élevage pendant 6 mois dans des bassins alimentés en eau de forage, pour analyser leurs capacités à éliminer les divers contaminants.

Des prélèvements d'organes et de tissus seront réalisés sur des lots de poissons à trois périodes : au lancement de l'expérimentation (T0), à la fin de la période de contact de 1 mois avec l'eau de la Garonne ou de la Dordogne (T30) et 6 mois plus tard (T210). Le nombre de poissons mis en expérimentation a été réduit au maximum, pour répondre au caractère particulier de l'espèce, tout en satisfaisant à deux critères : la masse minimale d'organe pour une analyse correcte des différents éléments et le nombre minimal de poissons dans chaque structure pour une comparaison statistique satisfaisante entre les différentes modalités.

Nous mettrons 100 jeunes esturgeons de 3 mois dans chacune des trois structures et les échantillons pour analyses porteront sur un total de 90 poissons, correspondant à 10 poissons à T0, 45 à T30 et 35 à T210. Les poissons vivants à la fin de l'expérimentation seront remis en élevage avec leurs congénères.

3567. Ce projet vise à une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation du muscle strié (squelettique et cardiaque) à des modifications des conditions environnementales physiologiques et/ou pathologiques. Grâce à des modèles expérimentaux les effets du sepsis, aigu et chronique, de l'inactivité et du désentraînement, des facteurs pro- et anti-inflammatoires vont être analysés du point de vue de l'électrophysiologie, de l'histologie, de la biochimie et de la biologie moléculaire sur la fonction musculaire. Ces travaux seront menés in vivo, ex vivo et in vitro sur 228 rats wistar.

A terme, ces travaux visent à trouver des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement et/ou la prévention des conséquences musculaires de certaines pathologies (aiguës ou chroniques) et du vieillissement. En particulier, une approche des effets bénéfiques des molécules anti-oxydantes sera menée car la production de radicaux libres entraînant un stress oxydant est une constante commune à ces différentes pathologies. Cela correspond à une valorisation des molécules naturelles isolées de plantes halophytes, dont des espèces endémiques.

Les expérimentations ont été conçues de façon à respecter les exigences de réduction, remplacement et raffinement.

Réduction : compte tenu du nombre de conditions expérimentales étudiées et de la durée du projet (5ans), ce nombre correspond à l'effectif minimal permettant une validation scientifique des résultats obtenus, conformément au plan d'expérimentation.

Remplacement : Il est prévu de limiter le recours ultérieur à l'expérimentation sur animaux vivants grâce à l'établissement de modèles mathématiques à partir des données obtenues lors de ces expérimentations..

Raffinement : Les expérimentations sont conçues de façon à permettre dans tous les cas des protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés. Un suivi régulier des animaux est assuré de façon à assurer leur bien-être et prévenir toute souffrance

3568. En moyenne, 14% des porcelets meurent avant le sevrage et la moitié de ces porcelets meurent au cours des 3 jours qui suivent la naissance. Les conditions de logement des truies pendant la gestation peuvent faire varier ce taux. Ainsi, les portées issues de truies élevées sur paille ont des taux de mortalité de la naissance au sevrage plus bas que les portées issues de truies élevées sur caillebotis. Par ailleurs, les truies logées pendant la gestation sur caillebotis ont des concentrations de cortisol et d'immunoglobulines plus élevées que celles logées sur paille. Ceci peut refléter un état de stress, qui pendant la gestation peut affecter l'ontogénèse des porcelets et modifier leur réactivité comportementale et physiologique. L'objectif de cette étude est de comprendre par quels mécanismes les conditions de logement des truies gravides influencent la mortalité néonatale de leurs portées. Deux systèmes de logement seront étudiés : un système conventionnel sur caillebotis et un système enrichi avec de la paille et avec un espace alloué par animal plus grand. Nous décrirons les performances des truies et des porcelets dans ces deux systèmes de logement (caillebotis vs paille). Nous explorerons en parallèle les comportements, la physiologie et l'immunité maternelles et juvéniles, ainsi que la composition nutritionnelle et immunitaire du colostrum.

Les effectifs sont adaptés selon les paramètres étudiés (variabilité) pour permettre une analyse statistique des résultats. Certaines mesures seront réalisées sur un grand nombre de truies (soit 72 truies par logement au maximum) et sur tous leurs porcelets. Les mesures plus fines seront réalisées sur un nombre réduit de truies (18 truies par logement) et de leurs porcelets (à la naissance : 6 par portée, soit 216 porcelets ; à 4 jours : 2 par portée, soit 72 porcelets), dans un objectif de réduction du nombre d'animaux. Trente-six porcelets seront euthanasiés selon la procédure légale. Aucune autre procédure utilisée sur les animaux n'aura de conséquences (dégradation de la santé) nécessitant leur euthanasie. L'ensemble des truies et des porcelets poursuivront leur carrière dans l'élevage.

Règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible car l'utilisation d'animaux est inhérente au type d'étude (amélioration des conditions d'élevage des porcs). Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum statistique en fonction des mesures effectuées. Enfin, toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers locaux, ainsi que par les différents intervenants, surtout entre la mise-bas et deux semaines après. Toute intervention potentiellement douloureuse ou stressante sera contrôlée, et les animaux suivis dans les minutes ou heures qui suivent. En cas de souci de santé, le vétérinaire sera consulté et les animaux traités en conséquence.

3569. Les carcinomes épidermoïdes (HNSCC) représentent 90% des cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS). Cette pathologie constitue le 6ème type de cancer le plus fréquent dans le monde. Particulièrement liés à l'environnement, les principaux facteurs de risque sont la consommation d'alcool, de tabac et l'infection par virus de type Papilloma (HPV). Ces facteurs participent à une augmentation de l'intolérance à des traitements souvent toxiques et à une diminution de leur efficacité. La survie de ces cancers ne s'est pas améliorée au cours des 10 dernières années et ce, malgré un effort constant d'adaptation des traitements. Les données épidémiologiques indiquent une variation de la survie globale à 5 ans de 40 à 50%. La récurrence locorégionale après traitement se produit dans plus de 50% des cas, généralement dans les deux ans après traitement et 5 à 30% des patients. En cas de récurrence locorégionale ou de dissémination métastatique, la médiane de survie n'excède pas 10 mois.

L'urgence tient donc à la recherche et à l'essai de nouvelles modalités de traitement.

Une première étude préclinique « association du temsirolimus au cetuximab et chimiothérapies par carboplatine/5-FU » avait permis de mettre en évidence la très forte efficacité d'une telle association de molécules sur le développement tumoral, le projet actuel, qui sera réalisé sur 105 souris, constitue son prolongement avec l'étude de la récurrence tumorale après arrêt du traitement.

Afin de respecter la règle des 3 « R » nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaire à cette étude, en effet aucune expérimentation pilote n'est nécessaire et le suivi de la croissance tumorale est réalisée par imagerie IVIS technique indolore qui permet là encore de réduire le nombre d'animaux.

L'ensemble de ces résultats pourrait permettre la réalisation optimale d'essais cliniques de phase II chez l'Homme.

3570. Les pathologies ostéo-articulaires sont aujourd'hui un problème de santé publique dont la prévalence augmente avec l'augmentation de l'âge de la population. Actuellement, les possibilités thérapeutiques proposées par la clinique ne permettent pas de régénérer un tissu cartilagineux articulaire, et de ce fait, sont incapables de restaurer entièrement la fonctionnalité de l'articulation. Cette étude a pour but d'analyser la régénération cartilagineuse et de l'os sous-chondral après implantation de notre biomatériau actif en site articulaire chez la Brebis. Suite à des études in vitro, nous avons montré l'efficacité de notre biomatériau en termes de régénération tissulaire, et avons également confirmé ces résultats après implantation chez le petit rongeur. Aujourd'hui, nous souhaitons confirmer ces résultats chez la brebis, modèle d'étude pour la régénération cartilagineuse. Pour cette étude, nous souhaitons ainsi implanter nos matériaux en présence de cellules souches mésenchymateuses adultes au niveau de lésions intrarticulaires effectuées au niveau du genou, en utilisant au maximum 48 brebis. Les données apportées par cette étude nous permettront ainsi de confirmer le potentiel de réparation ostéo-chondral de notre biomatériau et des capacités régénératrices des cellules souches mésenchymateuses associées à ce biomatériau. Nous serons vigilants à maintenir les animaux dans leurs groupes sociaux, sur paille, dans des conditions d'ambiance optimales. Nous veillerons particulièrement à les manipuler dans le calme. L'anesthésie et l'analgésie permettront de supprimer la douleur périopératoire.

3571. Le but de cette étude est de comprendre les effets de la galectine-3 (Gal3) sur le processus de cicatrisation in vivo chez la souris. Dans des expériences sur des cellules de mammifères en culture, nous avons mis en évidence un impact de la Gal3 sur la transmission des signaux, y compris ceux qui régulent la migration cellulaire. Le nouveau mécanisme que nous avons ainsi découvert implique une certaine classe de lipides, nommés glycosphingolipides (GSL). Cependant, il n'est pas possible de juger à partir de ces expériences in vitro si ce mécanisme innovant garde sa validité dans le contexte multicellulaire de l'organisme vivant. Pour valider ce point clé, la création de souris génétiquement modifiées pour la Gal3 et les GSLs est nécessaire. Des souris pour lesquelles le gène gal3 est totalement invalidé et d'autres pour lesquelles les GSLs peuvent être inactivés sont déjà disponibles. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, nous avons choisi de cibler cette invalidation génétique au niveau des villosités intestinales. Ceci sera possible grâce au croisement avec d'autres souris. Le processus de réparation tissulaire sera étudié selon deux méthodes (chimique à court terme (moins de 2 heures sous anesthésie) et microlésion superficielle à moyen terme (8 jours maximum)). Les souris sont suivies attentivement afin de veiller à ce que la blessure superficielle créée n'impacte pas sa qualité de vie. A la fin de cette étude, des fragments d'intestin seront prélevés post-mortem pour être analysés. Cette étude nécessitera un total de 80 souris.

3572. La carcinose péritonéale représente une maladie métastatique difficile à contrôler. Divers traitements ont montré une certaine influence sur les carcinoses péritonéales mais de nombreuses questions cliniques restent irrésolues. Notre unité a choisi de développer la recherche sur cette maladie, quelle que soit son origine : extension d'un cancer de l'ovaire, de l'estomac, du côlon, de l'appendice ou primitive du péritoine.

Pour évaluer l'effet d'un traitement, d'une modification du microenvironnement ou des gestes chirurgicaux associés, nous ne pouvons pas seulement effectuer des expériences in vitro. Seuls les modèles in vivo sont pertinents.

A chaque expérience, nous utiliserons un groupe contrôle pour 2 groupes testés, un groupe testé correspondant à un type de traitement, une stratégie chirurgicale ou autre. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Nous pouvons également être amené à utiliser un troisième groupe dans le cas d'une association entre 2 médicaments ou gestes chirurgicaux associés. Les points limites sont les suivants: perte de poids >20%, isolement, yeux fermés, dos voûté, déshydratation, automutilation. Ces points seront surveillés 2 fois par semaine et consignés dans un cahier de suivi par l'expérimentateur pour permettre de limiter au minimum la douleur de l'animal. Aussi, afin de limiter la souffrance des animaux, ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires. Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leur condition d'hébergement. Nous envisageons d'utiliser au maximum 577 souris pendant la durée du projet.

Pour reproduire la maladie nous voulons créer dans un premier temps un modèle de carcinose péritonéale plus ou moins limitée en fonction ce que l'on veut étudier. Pour cela, nous injecterons entre 10 000 et 10 000 000 de cellules humaines de cancer ovarien, gastrique ou colique dans la cavité péritonéale des souris immuno-déficientes nues ou des cellules murines de cancer ovarien, gastrique ou colique dans la cavité péritonéale de souris immuno-compétentes balb/c.

Pour cette première partie, 150 animaux au maximum seront nécessaires au cours des 5 années du projet, sachant qu'on n'aura pas besoin de refaire cette expérience à chaque fois.

La deuxième partie de l'étude consistera à tester l'effet sur la croissance tumorale de la carcinose péritonéale de: l'injection de différents anti-angiogéniques ou autre traitement, gestes chirurgicaux associés (hépatectomie majeur, clampage pédicule hépatique, ischémie de patte), modification du microenvironnement selon des modèles expérimentaux déjà connus par le laboratoire.

Pour cette deuxième partie, 293 animaux seront nécessaires au cours des 5 années du projet.

Seront réalisées l'analyse de la croissance tumorale et l'évaluation du score de carcinose péritonéale par bioluminescence (cellules marquées avec le gène de la luciférase). L'angiogenèse sera analysée en échographie doppler des artères à destinée digestive (artère mésentérique supérieure et tronc cœliaque). Ce suivi permettra de diminuer le nombre d'animaux.

3573. Un projet développé au laboratoire consiste à identifier les mécanismes moléculaires liés au développement tumoral d'une forme rare, mais très agressive de leucémie appelée « néoplasme blastique de cellules dendritiques plasmacytoïdes » (Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, BPDCN). Pour mieux comprendre la pathogenèse moléculaire de BPDCN, nous avons effectué des analyses moléculaires et fonctionnelles d'une nouvelle translocation équilibrée t(3;5)(q22;q31) observée dans une lignée cellulaire dérivée de BPDCN. Les conséquences moléculaires majeures de cette translocation sont une perturbation de la signalisation du récepteur aux glucocorticoïdes et l'activation de l'expression d'un nouvel ARN non-codant, le lincRNA-3q. Compte tenu du rôle émergent des longs ARN non-codants dans la régulation épigénétique et le développement tumoral, ce projet décrit la caractérisation fonctionnelle de ce long ARN non-codant dans le but de mieux comprendre son rôle dans la leucémogénèse.

Nous avons développé des lignées cellulaires invalidées pour l'expression du lincRNA-3q qui nous ont permis d'entreprendre sa caractérisation fonctionnelle dans plusieurs modèles cellulaires d'hémopathies malignes. Les résultats obtenus en lignées cellulaires confirmant l'hypothèse d'un rôle de ce nouvel ARN non codant dans le développement et la progression tumorale, nous souhaiterions pouvoir étudier l'influence de ce linc-RNA-3q sur la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe sur souris immunodéficientes (souris nude).

Ainsi, 2 expériences successives nous permettront :

- 1) d'évaluer la prise tumorale de ces lignées cellulaires dans les souris nude
- 2) d'évaluer le rôle du lincRNA-3q dans le développement et la progression tumorale (cellules knock-down lincRNA-3q vs cellules contrôles)

Pour réaliser l'ensemble de ce projet, 56 souris seraient nécessaires.

Respect de la règle des 3R :

-Ces souris seront hébergées dans un environnement dépourvu de germes pathogènes pour garantir l'absence de souffrance pouvant être engendré du fait de leur défaut d'immunité.

-Les cellules tumorales seront injectées à J7 en sous cutanée sous anesthésie à l'isoflurane à raison de 5 millions de cellules dans un volume total de 100µl en PBS. Niveau de douleur 0

-Aucune drogue ne sera administrée durant toute l'expérimentation.

-Le suivi du développement tumoral sera effectué au pied à coulisse tous les 2 jours.

-Les souris seront euthanasiées par dislocation cervicale quand la taille des tumeurs aura atteint 1,5cm<sup>3</sup> (limite acceptée par le comité d'éthique).

- 8 souris seront utilisées par lignée cellulaire, ce qui représente le nombre minimum pour obtenir des statistiques fiables. De plus, les tumeurs du lot 1 (évaluation de la prise tumorale) serviront comme contrôle dans le lot de souris n°2 (suivi de croissance tumorale entre tumeurs dérivées de lignées exprimant ou non le lincRNA-3q).

Cette estimation pourra être réévaluée si la prise tumorale s'avère plus faible que prévue

3574. Après un infarctus du myocarde, les cellules cardiaques de la région qui n'a plus été irriguée meurent et ne se régénèrent pas. À leur place se développe une fibrose : le tissu musculaire cardiaque se transforme en tissu fibreux. La zone du cœur concernée perd sa capacité de contraction. Pour compenser ce déficit, les cellules cardiaques saines s'élargissent, le cœur grossit. L'ensemble de ces phénomènes s'appelle le remodelage cardiaque. Son évolution peut se faire vers l'insuffisance cardiaque.

Il a été suggéré qu'une mise en veille du cœur détérioré pourrait permettre de (1) induire un phénomène de remodelage du ventricule gauche ou de réaliser des réparations chirurgicales (ventriculoplastie ou greffe des tissus).

Nous formulons l'hypothèse que la transplantation cardiaque hétérotopique (TCH), c'est-à-dire la greffe d'un cœur sur un autre site anatomique, permettrait de mettre au repos un cœur infarci et ainsi de créer les conditions de décharge myocardique permettant (1) d'abaisser sa capacité fonctionnelle à un niveau résiduel (2) de favoriser la réparation tissulaire post-infarci.

Nous souhaitons mener une étude expérimentale de greffe en position abdominale et de recherche des paramètres spécifiques du repos myocardique. Il s'agit d'une étude exploratoire sur 48 animaux avec des mesures fonctionnelles (1) d'imagerie (2) hémodynamiques permettant d'évaluer la fonction cardiaque.

Le modèle de rat Lewis est utilisé pour ses caractéristiques de consanguinité permettant une greffe hétérologue. Il permettra de comprendre les processus physiologiques rencontrés en clinique grâce à ses similitudes en terme d'hémodynamique et de morphologie cardiaque. C'est pour cela qu'il est nécessaire de travailler sur un organisme entier et vivant (remplacer).

Le modèle de transplantation cardiaque hétérotopique est déjà en place dans notre structure, notre expérience permet de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre total d'animaux sera de n=48 pour arriver à l'inclusion, mortalité déduite, de 40 animaux dans notre étude (8 par groupe) permettant ainsi des résultats statistiquement exploitables.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) mais aussi les méthodes utilisées (méthodologie opératoire très bien maîtrisée en microchirurgie selon les techniques dérivées de la clinique humaine, anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) permet ainsi un raffinement de la méthodologie.

3575. La surdité est un handicap sensoriel encore insuffisamment corrigé en France, avec un retentissement social non négligeable. Plus de 5% de la population mondiale, soit 360 millions de personnes, souffre de surdité. Dans ce projet, nous nous intéresserons à la surdité de perception, due à une atteinte de la cochlée (oreille interne), à travers deux approches thérapeutiques différentes:

-une approche mini-invasive, médicale, consistant à administrer un anti-inflammatoire (corticoïde) par voie locale, grâce à un gel innovant, qui pourrait avoir des indications dans des maladies aiguës et chroniques.

-une approche, plus invasive chirurgicale, l'implant cochléaire. L'implantation d'électrodes dans la cochlée va permettre de transmettre les informations directement aux neurones cochléaires à l'origine du nerf auditif. L'implant cochléaire permet de pallier la déficience auditive définitive.

Le développement de traitements locaux, pour soigner les maladies de l'oreille interne, est en plein essor, en alternative aux traitements par voie générale responsables d'effets secondaires du fait de la nécessité d'administrer de fortes doses de principe actif pour avoir une efficacité. Cette voie locale consiste à déposer le médicament dans l'oreille moyenne au contact de la fenêtre ronde qui est l'interface avec l'oreille interne. La molécule active peut alors diffuser dans l'oreille interne. A ce jour, peu de formes pharmaceutiques ont été développées spécifiquement pour cette voie d'administration. Dans ce travail, nous proposons un médicament innovant constitué d'un gel d'acide hyaluronique contenant des vésicules lipidiques appelées liposomes renfermant un anti-inflammatoire (corticoïde). L'acide hyaluronique devrait assurer une adhérence prolongée dans l'oreille moyenne grâce à son pouvoir adhésif; les liposomes devraient agir comme un réservoir de corticoïde pour une libération prolongée dans le temps, ce qui devrait limiter le nombre d'administrations.

L'objectif de ce travail est d'une part, d'évaluer la non toxicité du médicament sur la fonction auditive du cobaye normo-entendant et, d'autre part, d'étudier son devenir in vivo.

Dans un autre groupe d'animaux nous allons insérer des implants cochléaires soit manuellement soit grâce à un outil d'insertion. Lors de l'insertion manuelle du porte-électrode dans la cochlée, des traumatismes locaux sont générés. Ils

s'accompagnent d'une diminution de l'audition. Ces traumatismes devraient pouvoir être réduits par l'utilisation d'un outil d'insertion et un contrôle des forces d'insertion.

Une partie de ces animaux seront implantés avec le médicament cité précédemment. Nous étudierons ainsi l'effet protecteur potentiellement additif d'une insertion contrôlée et du traitement local.

Ainsi, nous avons retenu 85 cobayes normo-entendants pour garantir la validité statistique de l'étude. Un modèle animal est utilisé car une étude de l'audition est nécessaire pour tester ces deux approches thérapeutiques. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'audition. Les procédures expérimentales ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance psychique et/ou physique des cobayes.

3576. La carcinogenèse colique est un processus multifactoriel qui est associé à la dérégulation d'un ensemble de (proto)oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. A cet égard, un variant de la petite protéine G Rac-1 -impliquée dans la motilité cellulaire- est surexprimé dans les colites et dans les cancers colorectaux chez l'homme. Ce variant désigné Rac1b s'avère plus actif que Rac-1 suggérant son rôle moteur dans l'initiation et le développement du processus inflammatoire et/ou de la carcinogenèse digestive. Ces hypothèses sont étayées 1) par les effets de Rac1b sur la survie et la dissémination cellulaires mis en évidence ex vivo à l'aide de modèles de lignées cellulaires, et 2) par les relations fonctionnelles existant entre inflammation intestinale et cancers colorectaux.

Dans ce contexte, notre projet de recherche vise à évaluer 1) l'implication de Rac1b dans l'initiation de l'inflammation et/ou de la cancérogenèse colique consécutivement à sa surexpression ciblée au niveau de l'épithélium intestinal de souris transgéniques; 2) son implication dans le développement/ résolution du processus inflammatoire et dans la progression néoplasique à l'aide de modèles de colite et de carcinogenèse expérimentales; et 3) la potentialisation du pouvoir tumoral de lignées coliques in vivo, après xénogreffe chez la souris athymique. La mise en œuvre de ce projet nécessitera 300 souris.

Le développement de ce programme devrait permettre de caractériser les systèmes effecteurs et la fonction de la petite protéine G Rac1b et de préciser son implication dans le développement de deux pathologies humaines majeures, l'inflammation et le cancer. Il devrait aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la progression néoplasique et le processus inflammatoire, et l'identification de leviers permettant de contrôler ces pathologies.

En dehors des retombées attendues dans le cadre de la Recherche Fondamentale, ce programme ouvre des perspectives en Recherche Clinique dans la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ce variant d'épissage et leur validation à l'aide de nos modèles animaux.

3577. Le traitement des tumeurs coliques repose essentiellement sur l'exérèse de la tumeur primitive, combinée à une chimiothérapie adjuvante basée sur le 5-FU et les dérivés du platine dans le cas d'atteinte ganglionnaire ou de métastase à distance. Bien que ces chimiothérapies se montrent efficaces, le développement de nouveaux dérivés de ces agents pourrait améliorer leur biodisponibilité au niveau des cellules tumorales, leur efficacité anti-tumorale, diminuer les effets secondaires et améliorer le confort et la survie des patients.

Dans le cadre de notre projet, nous nous proposons d'évaluer l'efficacité thérapeutique de tels composés dans des modèles de cancérogenèse coliques chez la souris.

Ces études seront réalisées en adéquation avec la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). A cet égard, nous avons dans un premier temps établi sur des cellules en cultures, que l'activité anticancéreuse du nouveau composé était supérieure à celle de l'agent chimiothérapeutique conventionnel. Néanmoins, ces modèles in vitro ne permettent pas d'évaluer la stabilité/ élimination du composé par l'organisme, sa toxicité potentielle à l'échelle tissulaire, ni son activité antitumorale dans le contexte des interactions multiples existant entre les cellules cancéreuses, le tissu sain et les cellules du système immunitaire. Les modèles animaux demeurent non substituables pour appréhender ces différents aspects, mais leur utilisation sera restreinte au maximum dans le cadre de notre étude. Ainsi, le nombre de souris a été fixé à 10 par groupe pour s'affranchir des variations individuelles. Trois groupes expérimentaux seront constitués : souris traitées soit par l'agent chimiothérapeutique conventionnel, soit son dérivé, le 3ème groupe ne sera pas traité. Certaines expérimentations devront être renouvelées afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. La mise en œuvre de ce projet nécessitera 200 souris. Pour les analyses de pharmacocinétique et de biodistribution, nous utiliserons 10 rats pour chacun des deux groupes : administration soit de l'agent chimiothérapeutique conventionnel, soit de son dérivé.

Le développement de ce programme devrait permettre d'évaluer l'intérêt potentiel d'un nouveau composé pharmacologique et d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans son activité anticancéreuse. Ce projet ouvre des perspectives en recherche clinique dans le développement et l'application de nouvelles stratégies chimiothérapeutiques.

3578. Il s'agit d'étudier les effets cardiovasculaires et respiratoires des nouveaux neuropeptides, molécules endogènes régulatrices récemment caractérisées. Les neuropeptides sont des molécules ancestrales qui ont été conservées au cours de l'évolution des espèces animales. Nous souhaitons étudier leurs effets cardio-ventilatoires chez une espèce non-mammalienne, le poisson, afin de déterminer les actions primitives de ces neuropeptides. Certaines pathologies cardiovasculaires et ventilatoires chez l'homme (mort subite du nourrisson, hypertension, infarctus, ...) pourraient être liées à une anomalie d'action de ces neuropeptides. Aussi, ces molécules et leurs récepteurs servent dès à présent de cibles pour le développement de médicaments à visée cardiovasculaire. Nos travaux ont montré que le poisson est un excellent modèle pour une recherche fondamentale sur cette thématique neurocardiologique. Cette espèce animale évite d'utiliser des espèces mammaliennes (rat, souris,..) pour ces protocoles expérimentaux. Il s'agit clairement d'une recherche intégrative. Aucune

approche in vitro sur cellules isolées par exemple ne pourra se substituer à la démarche retenue qui explore les relations neuro-anatomiques et fonctionnelles entre le cerveau et le système cardio-respiratoire chez l'animal entier. L'abondante littérature scientifique sur le système cardio-respiratoire des poissons et notamment de la truite, sert de référence pour nos travaux ciblés sur la neurochimie des relations entre le cerveau, le cœur, les vaisseaux, et les mouvements ventilatoires. Afin de réduire le nombre des animaux utilisés au cours de ces trois années, (300 truites), chaque poisson sera son propre témoin. Les techniques opératoires pratiquées sous anesthésie générale, sont très proches des techniques appliquées en chirurgie humaine, et elles ont été validées chez les poissons depuis de nombreuses années. Un contrôle des paramètres cardiorespiratoires sera assuré tout au long des expériences afin de s'assurer que les fonctions vitales de l'animal ne sont pas compromises.

3579. Le refus d'incorporer des aliments nouveaux dans son alimentation est un comportement décrit dans un grand nombre de taxa chez les vertébrés dont l'homme. Chez l'homme, la néophobie alimentaire est considérée comme un problème de santé publique. Chez les espèces d'intérêt agronomique et économique, elle peut causer de fortes pertes financières pour les éleveurs (mammifères et oiseaux) et porter atteinte au bien-être animal. Par conséquent, de nombreux travaux sont menés afin d'identifier des moyens de «réduire» cette réaction de peur chez les jeunes individus avec, par exemple, des expériences de diversification des aliments à un âge précoce. D'un autre côté, très peu de moyens sont mis en œuvre pour comprendre l'origine développementale de ce comportement et donc potentiellement prévenir son expression.

Chez les oiseaux, au cours de la formation de l'œuf, les acides gras polyinsaturés présents dans l'alimentation de la mère peuvent passer dans le jaune (source nutritive des embryons). A ce jour les conséquences d'une exposition prénatale à des quantités variables d'acides gras sur le développement des comportements n'est pas étudiée.

L'objectif de ce projet sera de déterminer dans quelle mesure l'alimentation de la mère et plus particulièrement, le contenu en acides gras polyinsaturés de l'alimentation maternelle, peut modifier la qualité de l'environnement embryonnaire et l'expression de la néophobie alimentaire chez le jeune. L'embryon de poulet constitue un modèle de choix pour ces travaux puisque le développement de l'embryon s'effectue en dehors de l'organisme maternel, ce contexte permet de mieux contrôler l'environnement qui leur est fourni.

En se basant sur un ensemble de travaux antérieurs conduits au sein de notre unité nous estimons au total avoir besoin de 40 poules pondeuses et 100 poussins. Ces effectifs ont été calculés afin d'obtenir une puissance de tests statistiques comprise entre 70 et 95%. Des observations comportementales seront réalisées les 5 premières semaines de vie. Les animaux seront mis en vente en fin d'expérience.

3580. Chez le Xénope, la totalité du développement embryonnaire se produit en dehors de l'organisme maternel. Ce modèle d'étude est particulièrement bien adapté à l'étude des premières étapes du développement d'un embryon de vertébré. Les étapes du développement de l'embryon de Xénope sont bien documentées. Il est très aisé d'obtenir plusieurs centaines d'embryons synchrones par fécondation in vitro. Les génomes de *X. laevis* et *X. tropicalis* ont été séquencés. L'accès à ces ressources génomiques confère à ce modèle toutes les possibilités d'analyses moléculaires requises par le projet.

Le projet a pour objectif d'étudier l'engagement des cellules embryonnaires multipotentes vers une destinée rénale pour comprendre comment vont se différencier les différents types cellulaires constituant le rein. Chez le Xénope, le pronéphros est le rein du têtard. Bien que beaucoup plus rudimentaire, il est constitué des mêmes types cellulaires que le rein humain qui sont agencés en unité de filtration du sang de manière très similaire. La formation d'un rein fonctionnel chez le Xénope est achevée en deux jours de développement. Le développement du pronéphros chez l'embryon de Xénope est un modèle couramment utilisé pour l'étude de la néphrogenèse. L'espèce utilisée le plus couramment est *Xenopus laevis*, mais l'utilisation de *Xenopus tropicalis* est également requise dans des expériences nécessitant la réalisation de lignées génétiquement modifiées, car cette espèce est diploïde et son temps de génération est beaucoup plus court que pour *Xenopus laevis* (5 mois environ pour *X. tropicalis* contre 18 mois pour *X. laevis*).

Le projet requiert l'utilisation d'animaux pour l'obtention des embryons. Nous utilisons une méthode de fécondation in vitro qui requiert la mise à mort du mâle pour le prélèvement des testicules. Ceci est réalisé chez l'animal anesthésié. Elle est absolument indispensable car elle permet d'obtenir des lots d'embryons se développant de manière synchrone. Les femelles en revanche sont réutilisées après la ponte qui est obtenue par stimulation hormonale (injection d'hormone gonadotrope humaine -HCG- dans les sacs lymphatiques dorsaux). La ponte peut être induite tous les six mois environ (au minimum quatre mois).

Il est clair que l'étude du développement embryonnaire requiert de pouvoir analyser la plupart des processus mis en œuvre chez l'embryon. Ces études peuvent être complétées par des analyses sur des lignées cellulaires, mais sans pouvoir substituer ce type d'approche aux études chez l'embryon.

La règle des 3R est surtout applicable au nombre d'animaux utilisés. Il est évident que les lignées cellulaires ne peuvent pas se substituer à l'embryon, dès lors qu'on étudie le développement embryonnaire d'un organe (ici le rein) et que l'embryon ne peut pas être remplacé. Les possibilités de raffiner les protocoles utilisés sont très limitées. Les mâles sont bien évidemment anesthésiés pour le prélèvement des organes. Un programme d'enrichissement sera mis en place dans la nouvelle animalerie devant ouvrir courant 2015. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour les expériences, nous organisons le programme des expérimentations afin de pouvoir partager les embryons avec la deuxième équipe de notre département travaillant sur ce modèle expérimental (équipe « Biologie Expérimentale », UMR7622). Une femelle de Xénope peut pondre plusieurs milliers d'œufs ce qui permet d'obtenir assez d'embryons pour toutes les expériences. Nos deux équipes utilisent au

total 100 mâles de *X. laevis* par an (500 mâles au total pour le projet). Nous disposons de 300 femelles de *X. laevis* dans l'animalerie pouvant être stimulées tous les 4-6 mois. Certaines femelles ne répondant plus à l'HCG après plusieurs stimulations, nous sommes aussi amenés à renouveler certains animaux. Ceci représente en moyenne un renouvellement de l'ordre de 40 femelles par an (200 femelles pour la durée du projet). Dans le courant de l'année 2015, l'ouverture de la nouvelle animalerie nous permettra d'avoir accès à une seconde espèce de Xénope pour nos expériences, *X. tropicalis*. L'utilisation devrait être de l'ordre de 20 mâles par an (100 mâles au total) avec 40 femelles maintenues dans cette nouvelle animalerie. Nous évaluons la totalité des femelles de *X. tropicalis* pour la durée du projet à environ 50.

3581. Dans ce projet, nous étudions les désordres observés sur la prise alimentaire à court et à long terme suite à un Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU). Pour cela, nous utilisons un modèle de rat RCIU (souche Sprague-Dawley) par restriction protéique nutritionnelle de la mère au cours de la gestation (8% de protéines vs 20% de protéines chez les contrôles). Les rats mâles nés avec un RCIU sont soit adoptés par des mères continuant à recevoir un régime restreint en protéines pendant la lactation (rats restreints), soit adoptés par des rates recevant un régime contrôle durant la lactation (restreints avec rattrapage de croissance rapide).

L'objectif de cette étude est de tester l'hypothèse selon laquelle les défauts de prise alimentaire et de satiété observés chez les rats nés avec un RCIU pourraient être dus à une résistance vagale à la cholécystokinine (CCK), peptide satiétogène sécrété par l'intestin au moment du repas et jouant un rôle majeur dans l'intégration du signal nutritionnel vers le système nerveux central, via le nerf vague.

Le nombre de rats utilisés dans cette étude est réduit au minimum nécessaire aux études de prise alimentaire (n=12 par groupe, 3 groupes à 2 stades de développement (6 semaines et 5 mois), soit 72 rats mâles). Au sevrage, les rats seront élevés à 2 par cages puis en cage individuelle à partir de 400g, et nourris par un régime standard (AINS93, AO4, Safe). Les mères (n=24) seront mises à mort par asphyxie au CO<sub>2</sub> et élongation. Un enrichissement des cages individuelles est prévu (substrat cellulosique ou tunnel). Les animaux recevront au cours de leur développement 2 injections intra-péritonéales (une de sérum physiologique (contrôle) une autre de CCK (10nmol ; 3.3 µg/kg) à 10 j d'intervalle pour mesurer les effets satiétogènes de la CCK dans les différents groupes. Le niveau de douleur de l'injection intrapéritonéale est estimé de classe légère (aiguë et passagère). Un jeûne d'une durée maximale de 15h sera observé par les animaux avant les manipulations.

Des prélèvements sanguins à la queue sont prévus une fois dans la vie de l'animal pour obtenir des cinétiques de sécrétion de CCK en réponse postprandiale. Pour cela, nous administrons une pommade analgésique (lidocaïne 2%) sur le bout de la queue avant incision. Les prélèvements suivants sont réalisés en enlevant le caillot formé (la queue du rat ne subit pas de coupures successives).

A la fin des expérimentations, les animaux recevront une injection intrapéritonéale de CCK ou d'un antagoniste des récepteurs à la CCK (lorglumide, 10 mg/kg) pour bloquer les effets de la CCK endogène afin d'étudier l'effet de la CCK sur le nerf vague et seront mis à mort 2h après par asphyxie au CO<sub>2</sub> et élongation. Les tissus d'intérêts seront prélevés (ganglions plexiformes du nerf vague, tronc cérébral, hypothalamus, sang portal). Des perfusions intracardiaques de fixateur (paraformaldéhyde 4%) pour l'immunohistochimie seront réalisées sur 3 rats par groupe après anesthésie des rats sous isoflurane 2%.

3582. La rage est une encéphalite fatale dans 100% des cas. La maladie peut être prévenue si une vaccination de post exposition est entreprise rapidement après la contamination (généralement morsure par un animal enragé). Néanmoins, si la vaccination intervient trop tard ou n'est pas entreprise, il n'existe aucun traitement capable de bloquer la progression de l'infection dans le système nerveux. La connaissance de la biologie de ce virus a permis d'identifier des molécules qui pourraient bloquer l'infection rabique in vivo.

Ce projet consiste à valider in vivo l'efficacité de molécules modulatrices de l'infection rabique. Ces molécules ont été identifiées après que plusieurs séries d'expériences aient été conduites in vitro en culture cellulaire. Elles sont déjà utilisées en clinique humaine (inflammation et cancer) ou en passe de l'être.

La preuve de concept d'efficacité des molécules modulatrices de l'infection après leur identification in vitro requière les tests de protection contre une infection létale par le virus de la rage (modèle de rage expérimentale chez la souris). Il s'agira de tester si l'injection de ces molécules peut ralentir la progression du virus dans le système nerveux et protéger contre l'issue fatale de la maladie.

Le nombre d'animaux utilisé a été calculé en tenant compte des contraintes d'analyse statistique. Pour les 5 ans de ce projet, nous prévoyons de tester 4 molécules antivirales. Elles seront testées en utilisant deux voies d'inoculation de virus et plusieurs dilutions. Compte tenu de la nécessité de répliquer les expériences pour assurer la robustesse des résultats, et des tests de mise au point préliminaires, nous prévoyons d'utiliser au total 4392 souris dans deux procédures dont la gravité pourra être sévère en fonction des temps d'analyse des animaux et de l'efficacité des molécules. Des points limites ont toutefois été définis pour intervenir au plus tôt et éviter des souffrances inutiles aux animaux.

Le bénéfice de l'étude sera une meilleure compréhension de l'encéphalite rabique qui devrait permettre de mettre au point de nouveaux traitements pour cette maladie incurable

3583. La mitochondrie, organite cellulaire, est le siège de la phosphorylation oxydative au cours de laquelle des électrons sont transférés de molécules réductrices vers des oxydants tels que l'oxygène pour transformer l'ADP en ATP (forme d'énergie utilisable par la cellule). Environ 2 à 5% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est converti par le biais d'une fuite d'électrons en espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) connus principalement pour leurs effets délétères. La production excessive de ROS est dépendante entre autres de facteurs comme la pollution, le stress et l'exercice physique intense. Depuis

quelques années, leur rôle (à concentration modérée) dans la signalisation cellulaire et la régulation du métabolisme énergétique est largement documenté dans le cadre de l'exercice physique.

Au cours de ce projet, il s'agira d'étudier l'influence du sexe sur les liens entre performance physiologique et réponses radicalaires suite à un entraînement physique. Dans la littérature, il est souvent rapporté la difficulté de discuter les résultats avec d'autres études portant sur des animaux ou individus de sexe différent. En effet, il a été montré des différences d'activités des systèmes antioxydants et de dommages oxydatifs selon le sexe après entraînement<sup>1,2</sup> mais à notre connaissance l'impact du genre sur la fonction mitochondriale et les réponses radicalaires après entraînement reste peu étudié.

Le modèle rat nous servira pour ce projet car une étude sur l'homme reste impossible, le remplacement n'est donc pas possible. Dans le cadre de ce projet nous ne travaillerons que sur des individus femelles dont les résultats recueillis seront ensuite comparés avec ceux obtenus chez le mâle dans le cadre d'un précédent projet. Il est important de réaliser exactement le même protocole que précédemment pour pouvoir réaliser une comparaison mâles/femelles. Ainsi 20 rats femelles (10 entraînées et 10 sédentaires) suivront un protocole d'entraînement à la course d'intensité modérée à raison de 1h/j, 5j/sem pendant 6 semaines. Ce nombre de rats est un minimum en respectant le principe de réduction pour effectuer l'étude statistique des résultats obtenus suite à la réalisation des procédures expérimentales contenues dans ce projet. Tout au long du protocole, le raffinement des conditions de stabulation et du protocole d'entraînement chronique est bien respecté. L'utilisation du modèle rat ne peut être remplacé par d'autres modèles car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier. Ce projet prend donc en compte la règle des 3R

Les réponses métaboliques seront abordées sur ces rats selon deux approches : - une première in vivo (animal vivant) pour étudier l'effet de l'entraînement sur la performance de course: mesure de Vitesse Maximale Aérobie (VMA)

- une seconde in vitro (au niveau tissulaire) sur des fibres musculaires cardiaques et squelettiques pour étudier l'effet de l'entraînement à la fois sur le métabolisme énergétique mitochondriale (consommation d'oxygène, production d'ATP), sur le métabolisme des ROS (production, systèmes enzymatiques antioxydants, peroxydation lipidique) et sur l'effet des ROS sur le fonctionnement mitochondrial (sensibilité aux ROS). Notre choix s'est porté sur ces deux types musculaires : cardiaque et squelettique car il s'agit des tissus les plus sollicités lors de l'exercice physique.

3584. La génération de nouveaux modèles de souris génétiquement modifiées par techniques de transgénèse portant une ou plusieurs modifications génétiques est extrêmement importante puisque ces nouvelles lignées peuvent devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale et biomédicale, des modèles de maladies humaines ou de validation de cibles thérapeutiques.

Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse « classique » (additive, aléatoire) portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène exogène. Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse ciblée seront ou bien déficientes pour un gène (KO) ou incorporeront un nouveau gène ou une modification spécifique (KI), toujours dans un endroit déterminé (locus endogène). Bien qu'il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris modifiées génétiquement, la découverte de nouveaux gènes, nouveaux promoteurs, nouvelles régions régulatrices ouvre chaque jour la possibilité de génération de nouvelles souris transgéniques comme un outil puissant en recherche fondamentale et appliquée.

Ce projet concerne la génération de nouveaux modèles de souris génétiquement modifiées par techniques de transgénèse pour répondre aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Les techniques de transgénèse sont basées sur la microinjection d'embryons au stade préimplantatoire (< 4 jours après fécondation) de « transgènes » ou de cellules souches embryonnaires (cellules ES) modifiées.

La première étape pour aboutir un projet de transgénèse consiste à avoir un grand nombre d'embryons à modifier. C'est pourquoi nous utilisons la procédure de superovulation (traitement hormonal des femelles donneuses avec deux hormones avant l'accouplement avec les mâles reproducteurs) afin d'augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement. La superovulation permet donc de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée de souris transgéniques.

Les embryons fertilisés obtenus après superovulation sont ensuite micromanipulés afin de les modifier. Après microinjection, les embryons sont réimplantés moyennant une petite intervention chirurgicale chez des souris receveuses (préparées pour la gestation), qui permettront leur développement à terme. Les souriceaux nés de ces mères-porteuses seront ensuite analysés afin d'identifier les individus qui auront incorporé la modification désirée (transgéniques). Il est très peu probable que ces animaux présentent un phénotype dommageable. Toutefois, nous surveillerons attentivement le développement de tous les animaux transgéniques pour détecter précocement toute anomalie qui pourrait nécessiter des soins particuliers.

Lors de ce projet, nous créerons 3 à 5 nouvelles lignées pour chacune des 20 à 30 nouvelles modifications génétiques seront générées chaque année. Sur les 5 ans du projet, nous prévoyons l'utilisation au maximum d'un total de 51000 souris, dans 2 procédures de sévérité légère (48000 souris) et une procédure de sévérité modérée (3000 souris). Les procédures expérimentales ont été optimisées pour réduire le nombre d'animaux utilisés et réduire l'impact des gestes sur le bien-être des animaux. Nous aurons en particulier recours à des antalgiques pour réduire l'éventuelle douleur post-opératoire.

Au total, ce projet permettra la création de nouvelles lignées qui seront utiles à la recherche fondamentale et biomédicale.

3585. Anxiété et dépression sont deux pathologies souvent associées. Dans la pratique clinique, des anxiolytiques sont ainsi souvent prescrits en début de traitement antidépresseur, pour permettre un soulagement rapide du patient et une meilleure qualité de vie.

Néanmoins, le bénéfice réel d'une telle association n'est pas connu. Certaines études ont montré un effet bénéfique pour le patient, alors que d'autres montrent l'absence d'effet, voire que cette association pourrait aggraver l'anxiété du patient.

Le but de ce projet est d'identifier des anxiolytiques qui ont un effet bénéfique lorsqu'ils sont associés à des antidépresseurs. Il sera réalisé en deux parties, la première étant d'identifier les propriétés anxiolytiques et la seconde les propriétés antidépresseurs.

Les modèles *in vitro* ne permettant pas de modéliser l'anxiété ou la dépression, des modèles animaux doivent être utilisés pour la réalisation de ce projet. Les modèles animaux choisis (rats, souris) ont été largement étudiés et caractérisés, afin d'éviter une étape de mise au point et de permettre de limiter le nombre d'animaux nécessaires (groupes de 10 à 12 animaux). Ainsi, l'efficacité des molécules anxiolytiques d'intérêt seront testées seules afin de déterminer leur efficacité, puis elles seront testées en association avec un antidépresseur connu. Les tests utilisés mesurent le niveau d'anxiété ou de dépression de l'animal. Plusieurs tests complémentaires seront utilisés induisant des niveaux d'anxiété différents.

Il est décrit que 3 à 5 procédures maximum seront utilisées par composé dans la première partie de ce projet (mise en évidence des propriétés anxiolytiques). Chaque procédure est complémentaire et fait intervenir des conditions différentes. Néanmoins, si un composé montre un effet anxiolytique dans 3 procédures testées, ces résultats sont suffisants pour conclure sur sa nature anxiolytique. Le composé sera alors directement testé en association avec un antidépresseur. (Soit 4 à 6 procédures par molécule.)

Ce projet implique donc un maximum de  $4 \times 6 \times 12 \times 12 = 3456$  animaux (rats ou souris) par an soit 10368 animaux au maximum pour le projet.

3586. Le voriconazole est un antifongique ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché européenne en 2002 et dont l'utilisation est principalement préconisée pour le traitement des infections fongiques invasives sévères.

Entre autres effets indésirables, il est responsable de manifestations cutanées aiguës et chroniques, principalement par un mécanisme de phototoxicité. Plus récemment plusieurs publications ont montré que le voriconazole est également impliqué dans la survenue de carcinomes cutanés (multiples et souvent agressifs) si le traitement est maintenu de manière prolongée. Les mécanismes les plus probables pour expliquer ces manifestations cutanées sont une phototoxicité directement liée au principe actif ou à son métabolite N-oxydé, et une interaction avec le métabolisme des rétinoïdes. L'immunodépression de nombreux patients nécessitant le recours au voriconazole peut par ailleurs favoriser la survenue de néoplasies. Plusieurs points restent cependant inconnus, et des études dédiées, d'une part, à la phototoxicité et à la photocarcinogénèse du voriconazole sont nécessaires.

Nous avons déjà réalisé une étude de cytotoxicité du voriconazole *in vitro*, sur plusieurs modèles cellulaires, en combinaison avec des irradiations en UVA ou UVB. Cette première partie de l'étude nous a permis d'identifier les mécanismes précoces de la phototoxicité du voriconazole. Nous devons maintenant poursuivre notre compréhension des effets délétères du voriconazole à plus long terme et du point de vue d'un organisme entier dans le cadre d'une étude pré-clinique sur un modèle animal. Pour ce faire, l'utilisation d'un modèle de souris sans poils SKH-1 et de souris immunodéprimées et sans poils SHO constitue un modèle établi et parfaitement reproductible pour réaliser des études de phototoxicité et d'induction de cancers cutanés.

Le voriconazole sera administré aux souris par gavage oral (5 jours/semaine) et associé à un protocole d'exposition répétée aux UV (3 fois/semaine). Ces conditions seront appliquées pendant 6 mois ce qui nous permettra d'évaluer l'implication du voriconazole dans la survenue des cancers cutanés et de définir les principaux mécanismes impliqués.

Dans ce projet nous utiliserons 126 souris (63 souris SKH-1 et 63 souris SHO) :

Procédure 1 : une étude préliminaire est nécessaire sur un nombre restreint d'animaux (9 souris SKH-1 et 9 souris SHO) pour déterminer la dose optimale de voriconazole à administrer par voie orale pour obtenir de concentrations plasmatiques stables et proches des concentrations cibles chez l'humain (environ 2 mg/l). Le voriconazole étant plus rapidement métabolisé chez la souris que chez l'humain, il est nécessaire d'évaluer sa stabilité plasmatique pendant 3 semaines.

Procédure 2 : une étude préliminaire est également nécessaire et sera réalisé en parallèle de la procédure 1 sur un nombre restreint d'animaux (6 souris SKH-1 et 6 souris SHO) pour définir la réponse cutanée et la sensibilité des souris immunodéprimées à une exposition répétée aux UV pendant 3 semaines ce qui permettra de définir les modifications morphologiques et comportementales possibles des souris exposées aux UV et de déterminer la nature de la prise en charge pour ces modifications.

Procédure 3 : étude principale pour évaluer la photocarcinogénèse associée au voriconazole sur 96 souris (48 souris par souche) réparties en 12 groupes de 8 souris (nombre nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement exploitables) pour permettre l'ensemble des configurations (groupe contrôle, groupe voriconazole, groupe UVB, groupe UVA, groupe voriconazole+UVB, groupe voriconazole+UVA). L'utilisation des deux souches permettant de déterminer l'influence de l'immunosuppression dans le processus photocarcinogène.

3587. Le carcinome ovarien est la pathologie gynécologique associée à la plus forte mortalité dans les pays développés. La plupart des patientes diagnostiquées le sont à des stades avancés de la maladie, lorsque le cancer est déjà disséminé au-delà de l'ovaire.

Tandis qu'on observe souvent une réponse initiale à la chirurgie et la chimiothérapie, le pronostic à long terme est généralement non favorable, associé à l'apparition de récidives et à la mise en place de phénomènes de résistance aux drogues. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles murins de carcinome ovarien constituent d'excellents modèles pour étudier la biologie de la tumeur face à de nouveaux traitements.

L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un dodécapeptide cyclique ciblant l'interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine-1 (ou TSP-1), et l'un de ses récepteurs cellulaires.

Le peptide proposé a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. La protéine ciblée étant fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, le peptide considéré est susceptible en se comportant comme antagoniste de l'interaction ciblée de limiter la vascularisation associée à la tumeur afin d'inhiber le développement tumoral. L'éventuel effet anti-tumoral du peptide sera testé à la fois dans un modèle de tumeur sous-cutanée et dans un modèle de tumeur colonisant la cavité péritonéale, en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses ovariennes humaines (A2780, SKOV-3 et OVCAR-3) chez la souris athymique BALB/C nu/nu (20 souris par lot seront considérées, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines – une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif). Les propriétés antiangiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Afin de limiter le nombre d'animaux, le développement tumoral ainsi que la vascularisation associée à la tumeur seront suivis de manière longitudinale par micro-tomographie à rayons X, dans le but de mettre en évidence sous l'effet du peptide d'intérêt une éventuelle diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. De même, la présence d'éventuels signes de thrombose, d'embolie ou d'hémorragie consécutives à l'utilisation d'un tel agent anti-angiogénique sera évaluée par cette même méthode d'imagerie. Les effets du peptide sont cependant supposés se restreindre au stroma tumoral au sein duquel la protéine ciblée est fortement surexprimée. Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux), en cas d'ulcération de la tumeur (modèle sous-cutané) qui se produit parfois consécutivement à une nécrose importante sous l'effet d'un agent anti-angiogénique, ou lorsque la tumeur atteint un volume critique de 1 cm<sup>3</sup>.

3588. L'adénocarcinome ductal pancréatique (ou PDAC) est un cancer agressif présentant un taux de survie à 5 ans de moins de 5%. Après résection de la tumeur, les patients souffrant de PDAC présentent souvent des récives avec une forte incidence métastatique qui explique un très mauvais pronostic clinique. L'angiogenèse tumorale est un facteur principal dans la prolifération, l'invasion, la dissémination métastatique et la sensibilité aux agents thérapeutiques dans le cadre des adénocarcinomes pancréatiques. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles murins de carcinome pancréatique constituent d'excellents modèles pour étudier la biologie de la tumeur face à de nouveaux traitements. L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un dodécapeptide cyclique ciblant l'interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine-1 (ou TSP-1), et l'un de ses récepteurs cellulaires. Le peptide proposé a déjà fait état de fortes propriétés antiangiogéniques dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. La protéine ciblée étant fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, le peptide considéré est susceptible en se comportant comme antagoniste de l'interaction ciblée de limiter la vascularisation associée à la tumeur afin d'inhiber le développement tumoral. L'éventuel effet antitumoral du peptide sera testé dans un modèle de tumeur sous-cutanée, en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses pancréatiques humaines (PANC-1, MIA PaCa-2 et Capan-1) chez la souris athymique BALB/C nu/nu (20 souris par lot seront considérées, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines). Les propriétés anti-angiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Afin de limiter le nombre d'animaux, le développement tumoral ainsi que la vascularisation associée à la tumeur seront suivis de manière longitudinale par micro-tomographie à rayons X, dans le but de mettre en évidence sous l'effet du peptide d'intérêt une éventuelle diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. De même, la présence d'éventuels signes de thrombose, d'embolie ou d'hémorragie consécutives à l'utilisation d'un tel agent antiangiogénique sera évaluée par cette même méthode d'imagerie. Les effets du peptide sont cependant supposés se restreindre au stroma tumoral au sein duquel la protéine ciblée est fortement surexprimée. Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux), en cas d'ulcération de la tumeur qui se produit parfois consécutivement à une nécrose importante sous l'effet d'un agent anti-angiogénique, ou lorsque la tumeur atteint un volume critique de 1 cm<sup>3</sup>.

3589. Le mélanome est le 6ème cancer le plus commun et également l'un des cancers cutanés les plus agressifs pour lequel il n'existe pas de traitement efficace à l'heure actuelle (source Cancer Research UK). Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui se mettent en place face aux traitements existants. Dans l'optique du développement de telles molécules, le modèle murin syngénique de

mélanome B16 chez la souris C57Bl/6J constitue un excellent modèle pour étudier la biologie de la tumeur face à de nouveaux traitements, tout en présentant l'avantage de conserver un animal immunocompétent ; ce paramètre pouvant fortement influencer la progression tumorale. L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un dodécapeptide cyclique ciblant l'interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine-1 (ou TSP-1), et l'un de ses récepteurs cellulaires. Le peptide proposé a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. La protéine ciblée étant fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, le peptide considéré est susceptible en se comportant comme antagoniste de l'interaction ciblée de limiter la vascularisation associée à la tumeur afin d'inhiber le développement tumoral. L'éventuel effet anti-tumoral du peptide sera testé dans un modèle de tumeur sous-cutanée, en considérant l'inoculation de cellules de mélanome murin B16F1 chez la souris C57Bl/6J (20 souris par lot seront considérées, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines – une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif).

Les propriétés anti-angiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Afin de limiter le nombre d'animaux, le développement tumoral ainsi que la vascularisation associée à la tumeur seront suivis de manière longitudinale par microtomographie à rayons X, dans le but de mettre en évidence sous l'effet du peptide d'intérêt une éventuelle diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. De même, la présence d'éventuels signes de thrombose, d'embolie ou d'hémorragie consécutives à l'utilisation d'un tel agent anti-angiogénique sera évaluée par cette même méthode d'imagerie. Les effets du peptide sont cependant supposés se restreindre au stroma tumoral au sein duquel la protéine ciblée est fortement surexprimée. Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux), en cas d'ulcération de la tumeur qui se produit parfois consécutivement à une nécrose importante sous l'effet d'un agent anti-angiogénique, ou lorsque la tumeur atteint un volume critique de 1 cm<sup>3</sup>.

3590. Le cancer pancréatique est un cancer agressif présentant un taux de survie à 5 ans de moins de 5%. Après résection de la tumeur, les patients souffrant de ce type de cancer présentent très souvent des récives avec une forte incidence métastatique qui explique un très mauvais pronostic clinique. L'angiogenèse tumorale est un facteur principal dans la prolifération, l'invasion, la dissémination métastatique et la sensibilité aux agents thérapeutiques dans le cadre des cancers pancréatiques. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, le modèle murin d'insulinome pancréatique spontané considéré dans le présent projet constitue un excellent modèle principalement de par le fait qu'il mime parfaitement toutes les étapes de la mise en place d'une importante vascularisation associée à la tumeur (« switch » angiogénique). Ainsi, ce modèle est particulièrement adapté pour étudier la biologie de la tumeur en réponse à de nouveaux traitements anti-angiogéniques. L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un dodécapeptide cyclique ciblant l'interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine-1 (ou TSP-1), et l'un de ses récepteurs cellulaires. Le peptide proposé a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. La protéine ciblée étant fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, le peptide considéré est susceptible en se comportant comme antagoniste de l'interaction ciblée de limiter la vascularisation associée à la tumeur afin d'inhiber le développement tumoral. L'éventuel effet anti-tumoral du peptide sera testé en considérant le modèle de souris génétiquement modifiées RIP1-Tag2 (fond génétique C57Bl/6) qui développent spontanément un insulinome pancréatique dès l'âge de 5 semaines (40 souris par lot seront considérées, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seul, en considérant à la fois des souris mâles et des souris femelles en proportions équivalentes – une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif). Les propriétés anti-angiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Le bénéfice attendu consécutivement au traitement par le peptide d'intérêt concernera ici une diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur.

Bien que les effets du peptide sont supposés se restreindre au stroma tumoral au sein duquel la protéine ciblée est fortement surexprimée, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) constituera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour toute perte importante de masse corporelle (15% de la masse des animaux).

3591. Le carcinome ovarien est la pathologie gynécologique associée à la plus forte mortalité dans les pays développés. La plupart des patientes diagnostiquées le sont à des stades avancés de la maladie, lorsque le cancer est déjà disséminé au-delà de l'ovaire. Tandis qu'on observe souvent une réponse initiale à la chirurgie et la chimiothérapie, le pronostic à long terme est généralement non favorable, associé à l'apparition de récives et à la mise en place de phénomènes de résistance aux drogues. Il existe donc un besoin important d'identifier de nouveaux agents thérapeutiques prolongeant la durée de survie et

contrecarrant les résistances qui s'établissent. Dans l'optique du développement de telles molécules, les modèles murins de carcinome ovarien constituent d'excellents modèles pour étudier la biologie de la tumeur face à de nouveaux traitements. L'objectif du projet est d'évaluer le potentiel anti-tumoral d'un dodécapeptide cyclique ciblant l'interaction entre une protéine de la matrice extracellulaire, la thrombospondine-1 (ou TSP-1), et l'un de ses récepteurs cellulaires.

Le peptide proposé a déjà fait état de fortes propriétés anti-angiogéniques dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. La protéine ciblée étant fortement exprimée au sein du microenvironnement tumoral, le peptide considéré est susceptible en se comportant comme antagoniste de l'interaction ciblée de limiter la vascularisation associée à la tumeur afin d'inhiber le développement tumoral. L'éventuel effet anti-tumoral du peptide sera testé dans un modèle de tumeur orthotopique, en considérant l'inoculation de cellules cancéreuses ovariennes murines ID8 dans un modèle syngénique murin dans la lignée C57Bl/6J (20 souris par condition expérimentale seront considérées, y compris pour les contrôles en présence d'un peptide supposé inactif ou du solvant des peptides seul, en ne considérant par souci de reproductibilité que des souris femelles âgées de 8 semaines – une étude préliminaire permettra de déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement significatif)). Les propriétés antiangiogéniques du peptide d'intérêt ayant déjà été largement démontrées dans les modèles *in vitro* et *ex vivo*, et l'intérêt thérapeutique de cibler l'interaction visée étant par ailleurs particulièrement bien décrit dans la littérature, ces expérimentations complémentaires constituent un prérequis indispensable afin de consolider la preuve de concept de l'efficacité du peptide avant d'envisager son utilisation dans le cadre d'essais cliniques. Le bénéfice attendu consécutivement au traitement par le peptide d'intérêt concernera ici une diminution significative du volume tumoral et/ou de la longueur et du volume moyens des vaisseaux sanguins alimentant la tumeur. Les effets attendus du peptide sont supposés se restreindre au stroma tumoral au sein duquel la protéine ciblée est fortement surexprimée. Cependant, un suivi quotidien des animaux sera assuré afin de limiter toute souffrance. Ainsi, toute modification du comportement (isolement, anxiété, ataxie) sera une indication pour l'euthanasie des animaux. Il en est de même pour tout gain ou perte important(e) de masse corporelle (15% de la masse des animaux), ou encore en cas de distension abdominale importante sous l'effet de la production d'ascite.

3592. Les pathologies liées à une anomalie du développement de la myéline ou à sa destruction comme les leucodystrophies ou la sclérose en plaques sont responsables de troubles neurologiques important incluant des dysfonctionnements cognitifs ou moteurs qui sont liés à une atteinte axonale. A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de guérir ces maladies ou pouvant retarder la mort prématurée des enfants dans le cas des leucodystrophies. La thérapie cellulaire, basée sur l'utilisation de cellules souches pour régénérer les tissus endommagés, apparaît comme une stratégie très prometteuse pour traiter des maladies neurologiques comme des maladies dé/dysmyélinisantes.

L'intérêt de notre projet est de réaliser les premières greffes de précurseurs neuraux (issus de fœtus humains précoces) et d'oligodendrocytes humains dans un modèle murin de la forme sévère de la maladie de Pelizaeus Merzbacher (PMD), et d'ainsi évaluer leur potentiel thérapeutique dans cette leucodystrophie. Dans le but de palier au risque de rejet des cellules humaines greffées, les expérimentations seront réalisées sur des souris transgéniques immunodéficientes (Plp-tg :Rag), présentant à la fois une invalidation du gène Rag2 et une surexpression du gène de la protéine protéolipide 1 (PLP1). Les effets thérapeutiques des cellules greffées sur la réparation anatomique seront testés en post-mortem par immunohistochimie et microscopie électronique sur 600 souris. De plus, ils pourront être évalués au niveau clinique par une série de tests moteurs et cognitifs. Les résultats issus de ce projet devraient permettre d'établir l'intérêt de la thérapie cellulaire pour favoriser la myélinisation chez des patients atteints de la PMD.

Afin de réduire d'un tiers le nombre d'animaux à utiliser, aucune greffe ne sera réalisée sur les souris wild type. Les souris hétérozygotes, qui présentent des phénotypes similaires aux souris wild type, serviront de contrôle. Dans la même volonté de diminuer au maximum le nombre de portées pour réaliser nos expériences, les 2 sexes seront utilisés indistinctement. Dans le but d'atténuer toute forme de souffrance, un antalgique (buprénorphine) sera administré en sous cutané durant les 4 jours suivant toute chirurgie réalisée sur des souris adultes. Par ailleurs, un nid de coton sera placé dans chaque cage afin d'enrichir l'environnement de tous les animaux.

3593. La sclérose en plaque (SEP) est une maladie neurologique chronique, souvent invalidante, qui touche uniquement le système nerveux central (cerveau, moelle épinière et nerf optique). C'est une maladie auto-immune affectant la myéline, qui est une structure entourant les axones, dont le rôle est d'assurer une conduction rapide de l'influx nerveux. En plus des atteintes axonales induisant des déficits irréversibles, des troubles visuels et moteurs apparaissent chez les patients développant la SEP.

A ce jour, il n'existe aucun traitement permettant de guérir ces maladies, cependant la thérapie cellulaire, basée sur l'utilisation de cellules souches pour régénérer des tissus endommagés, apparaît comme une stratégie très prometteuse pour traiter des maladies neurologiques comme des maladies démyélinisantes.

Nous proposons, dans ce projet, de réaliser des greffes de précurseurs et de cellules souches de type neural de rongeurs et de primates dans un modèle murin de dysmyélinisation, au cours du développement pour tester leur dynamique de différenciation en oligodendrocytes et potentiel de réparation de la myéline. Dans le but de palier au risque de rejet des cellules humaines greffées et d'optimiser les greffes de cellules de rongeurs, les expérimentations seront réalisées sur des souris shiverer:Rag2<sup>-/-</sup> (n=840), présentant à la fois une invalidation du gène Rag2 et une délétion de 7 exons du gène de la MBP, ce système permettant de reconnaître en immunohistochimie et microscopie électronique la myéline MBP<sup>+</sup> et compactée des cellules greffées, de la myéline shiverer MBP<sup>-</sup> et non compactée. La dynamique de différenciation et les effets thérapeutiques des cellules greffées sur la réparation anatomique seront testés en post-mortem par immunohistochimie et

microscopie électronique. Cette étude devrait contribuer au développement de futures stratégies thérapeutiques applicables à des modèles primates non-humain puis à l'homme afin de prévenir l'installation de troubles neurologiques. Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, aucune greffe ne sera réalisée sur les souris wild-type. Les souris hétérozygotes, qui présentent des phénotypes similaires aux souris wild-type, serviront de contrôle. Dans la même volonté de diminuer au maximum le nombre de portées pour réaliser nos expériences, les 2 sexes seront utilisés indistinctement. Un nid de coton sera placé dans chaque cage afin d'enrichir l'environnement de tous les animaux.

3594. Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies clonales caractérisées par des cellules dysplasiques dans la moelle osseuse et des cytopénies périphériques et surtout l'anémie. Ce sont des maladies hétérogènes classées en SMD de risque faible et élevé. Les SMD de risque élevé ont une plus forte propension à se transformer en leucémies aiguës myéloïdes (LAM définies par plus de 20% de blastes dans la moelle). Dans les SMD de haut risque, on distingue les AREB-1 et les AREB-2 en fonction du % de blastes médullaires (inférieur et supérieur ou égal à 10% de blastes). Chez ces patients, la priorité est de retarder le risque de transformation en LAM. Il a été montré que la chélation du fer pourrait améliorer la survie sans progression après une greffe allogénique de SMD / LAM dans les études rétrospectives. En outre, une étude récente a montré que la chélation du fer pourrait induire la différenciation dans les LAM. Des études sont actuellement en cours pour tester l'association de 5- azacytidine et deferasirox (DFX) chez les patients atteints de MDS à haut risque. Mais on ne sait pas si le DFX a un effet direct sur les cellules souches leucémiques et sur la clonogénicité des progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse, et quelles voies de signalisation pourraient être impliquées dans cet effet. Dans la LAM, il a été démontré que le DFX pourrait agir par l'activation de la voie MAPK et en synergie avec la Vit D pourrait induire la différenciation monocyttaire de blastes myéloïdes. Dans les cellules K562, le DFX induit REDD1 qui inhibe la voie mTOR en induisant TSC2 et Rheb. Il a également été montré qu'il peut inhiber NF- KB dans les SMD. Les objectifs de cette étude sont de tester l'effet du déférasirox sur la viabilité, la croissance des cellules souches leucémiques de SMD à haut risque, dans un système de coculture avec des cellules stromales in vitro puis dans un système de souris NSG in vivo, et de corrélérer ces effets avec plusieurs mécanismes d'action sur les voies de signalisation (PI3K / mTOR / MAPK / NFKB / beta -caténine ). L'objectif étudié dans les souris NSG sera d'évaluer le degré de prise de greffe des CD34+ de SMD dans les souris NSG en absence et en présence de déférasirox (le postulat étant que le DFX diminue le taux de prise de greffe des CD34+ dans les souris NSG s'il a un effet anti-leucémique). Toutes les études décrites seront menées dans des CD34 + de patients atteints de SMD.

Dans ce projet, nous utiliserons 288 souris NSG irradiées afin de comparer la prise de greffe leucémique d'échantillons de SMD en présence ou pas de deferasirox. On testera dans un premier temps 6 échantillons pathologiques.

Une injection intrafémorale de CD34+ et de MSC (cellules souches mésenchymateuses) issues d'un même échantillon de moelle sera effectuée avec différentes concentrations de DFX (20mg/kg et 50mg/kg), ce qui fait 4 conditions par échantillon (1-souris sous DFX seul, 2-souris avec coinjection intrafémorale de CD34+ et de MSC 3- souris avec coinjection intrafémorale de CD34+ et de MSC et DFX 20mg/kg à partir de S12, 4- 3- souris avec coinjection intrafémorale de CD34+ et de MSC et DFX 50mg/kg à partir de S12). En effet, des travaux récents (Medyouf et al, ASH 2012 et 2013) montrent que la coinjection de CD34+ et de MSC améliore la prise de greffe dans les NSG.

Une expérience utilisera 6 échantillons de moelle de patients donc 24 souris.

Nous réaliserons 3 expériences indépendantes avec des groupes de 24 souris chacune (donc au total n=72 souris).

Ce projet nécessitera au total 144 reproducteurs (48 mâles et 96 femelles) qui serviront pour produire les 72 animaux destinés à l'expérimentation : soit 3 lots de 24 souris nées dans la même quinzaine. Des souriceaux surnuméraires seront inexorablement produits, leur nombre est estimé au maximum à 72. C'est donc un maximum de 288 souris qui seront utilisées pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum mais est nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Les expériences se feront sur animal entier, puisque l'on étudie une prise de greffe médullaire après injection intrafémorale d'échantillons primaires issus de patients. La douleur sera minimisée par utilisation d'antalgiques.

3595. Chez l'homme, l'exposition au bisphénol A (BPA), qui est un contaminant alimentaire libéré à partir des emballages alimentaires, est mal connue. Pour évaluer les quantités de BPA auxquelles l'homme est exposé, il est nécessaire de caractériser ses processus d'absorption orale et d'élimination par une approche pharmacocinétique. Cette approche requiert l'administration de BPA par voie intraveineuse et la réalisation de prélèvements à un intervalle de temps régulier à la fois (i) de sang afin d'évaluer l'évolution au cours du temps des concentrations plasmatiques en BPA, (ii) d'urine et de fèces afin d'identifier l'importance relative des voies urinaires et fécales d'élimination du BPA. Etant donné que cette approche ne peut pas être mise en œuvre chez l'homme, nous avons utilisé deux espèces animales pertinentes pour l'homme d'un point de vue de la physiologie gastro-intestinale, le chien et le porc. L'intérêt de ces espèces est également l'importance de leur volémie qui autorise les prélèvements de sang, d'urine et de fèces répétés, ce qui permet de réduire à 3 le nombre d'individus par espèce dans le respect des 3Rs et d'accroître la précision des mesures alors que les rongeurs ne peuvent être normalement prélevés qu'une seule fois.

3596. Le cerveau antérieur, qui comprend le cortex cérébral et la mosaïque de noyaux des ganglions de la base, permet de percevoir l'environnement, établir des réponses motrices adaptées et réaliser des tâches cognitives élaborées. Ces fonctions dépendent de l'activité de réseaux complexes de neurones, qui commencent à se mettre en place au cours du développement embryonnaire, via une chorégraphie de migrations neuronales et assemblage de connexions. Comprendre comment ce processus se met en place est essentiel pour les neurobiologistes comme pour les cliniciens, car des défauts de développement du cerveau antérieur ont été associés à plusieurs pathologies neurologiques et psychiatriques. Notre laboratoire aborde ces

questions en utilisant le modèle de la souris car il permet les manipulations génétiques et les mécanismes de développement de son cerveau sont proches de celui de l'homme.

Dans ce projet, nous étudierons le rôle de processus migratoires dans le développement des circuits du cerveau antérieur. Nous allons d'une part analyser : i) comment la migration cellulaire contribue à la formation d'une structure clé des ganglions de la base, le striatum, ainsi qu'un territoire adjacent (l'amygdale étendue centrale) ; ii) quel est l'impact d'un défaut de développement sur la mise en place des circuits. D'autre part, nous allons analyser les mécanismes contrôlant la migration de neurones corticaux, les cellules de Cajal-Retzius ainsi que l'impact d'une migration défectueuse sur la morphogenèse des circuits corticaux.

Ce projet permettra de caractériser les rôles clés de migrations neuronales dans la formation des structures (ganglions de la base/ cortex cérébral) ainsi que de déterminer comment des défauts de ces migrations impactent de manière globale sur l'émergence de circuits cérébraux fonctionnels.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale avec l'objectif de réduire au maximum le nombre d'animaux employés. De ce fait, les expériences réalisées seront optimisées dans la mesure du possible et les manipulations in vitro seront utilisées à la place du modèle in vivo dès que la problématique le permet.

Ce projet de recherche nécessitera environ 2000 animaux.

3597. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie progressive et fatale du jeune adulte. Caractérisée par une augmentation de la pression sanguine dans les artères pulmonaires, l'HTAP aboutit à une défaillance cardiaque fatale. Il n'existe à ce jour aucun traitement et la survie à 3 ans n'est que de 60%. Seule une transplantation pulmonaire ou cardiopulmonaire permet la guérison du patient, mais les conséquences de ce geste chirurgical sont lourdes et la survie des patients reste faible (50 % des patients sont en vie 5 ans après la transplantation). Il est donc urgent de trouver des nouvelles pistes thérapeutiques.

Les mécanismes conduisant à une HTAP sont peu connus à ce jour, ce qui rend complexe la détermination de nouveaux traitements. De plus, plusieurs acteurs sont responsables de l'HTAP avec notamment les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, et les cellules inflammatoires. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces différents types cellulaires, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle.

Notre équipe étudie l'effet du Dasatinib sur le développement de l'HTAP. Le Dasatinib est un inhibiteur de la famille de médicament appelée « Inhibiteurs Tyrosines Kinases ». Ce médicament est utilisé comme traitement de 2ème ligne dans la leucémie myéloïde chronique (un cancer du sang et de la moelle). Cependant, il a été récemment rapporté qu'un très faible pourcentage (<1%) des patients traités par le Dasatinib présentaient des signes de développement d'une HTAP. C'est pourquoi nous avons entrepris des travaux visant à mieux comprendre les origines de cet effet secondaire dans l'optique d'améliorer ce traitement et pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie. Pour cela, nous avons déjà mis au point des techniques alternatives avec notamment la culture de cellules endothéliales humaines in vitro. Nos données confortent que le Dasatinib peut provoquer une apoptose cellulaire et peut être expliquer pourquoi certaines personnes pourraient développer une HTAP suite à la prise de ce médicament. Mais comme l'HTAP est une maladie complexe qui ne peut être reproduite entièrement in vitro et le recours à l'expérimentation animale apparaît indispensable. Dans notre projet, nous devons avoir recours à des rats injectés au Dasatinib ou non pour évaluer leur susceptibilité au développement de la maladie au travers des modèles d'étude de l'HTAP in vivo : modèle monocrotaline, hypoxie chronique et SUGEN+hypoxie. Ces travaux sont essentiels à ce stade de nos recherches et permettront non seulement d'améliorer le traitement Dasatinib mais aussi nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de l'HTAP.

Pour répondre à cette question essentielle afin de trouver une solution thérapeutique pour cette maladie dévastatrice et tout en tenant compte de la règle des 3R, le nombre total de rats nécessaire est estimé à 540. En effet, nous avons réduit le nombre d'animaux par groupe à 10, ce qui nous permettra d'avoir des données fiables pour ce travail par expérience. De plus, nous avons remplacé, à chaque fois que possible, les expérimentations animales par des méthodes alternatives développées dans notre laboratoire faisant appel notamment à des cultures cellulaires et nous avons privilégié des techniques d'analyses non invasive comme de l'échocardiographie. Des points limites ont également été établis.

3598. Le but de notre recherche est de tester l'effet de métaux lourds largement présents dans l'environnement urbain (zinc, plomb, cuivre) sur l'investissement des parents dans la reproduction. L'investissement dans la reproduction sera évalué d'une part en mesurant le transfert d'anticorps de la mère à ses œufs, d'autre part en mesurant la production d'une hormone de stress (corticostérone) et de plusieurs hormones de soins parentaux (testostérone, prolactine, œstradiol, ocytocine, hormone de croissance) à la fois chez les parents, dans les œufs et chez les juvéniles et enfin en évaluant le succès reproducteur (qualité des œufs, survie et croissance des juvéniles). Par ailleurs nous nous intéresserons à la variabilité de ces réponses en fonction du mélanisme de l'oiseau (quantité de mélanine présente dans son plumage).

Nous soumettons 144 pigeons féroces urbains *Columba livia* maintenus en captivité en volière extérieure à 4 traitements expérimentaux :

Un groupe témoin non supplémenté en métaux

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) sera supplémentée en zinc

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) sera supplémentée en plomb

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) sera supplémentée en cuivre

L'ensemble des femelles (72 individus) seront injectées avec un antigène entraînant la production d'anticorps spécifiques

Les dosages hormonaux chez les parents et les juvéniles se feront grâce à la réalisation de prises de sang (1 prise de sang pour le dosage de l'ensemble des hormones de soins parentaux et deux prises de sang pour le dosage de corticostérone). Une quatrième prise de sang sera effectuée au préalable afin de mesurer les concentrations sanguines en métaux. Un œuf sur deux sera prélevé afin de doser les anticorps anti-KLH ainsi que les hormones étudiées. La taille de l'ensemble des œufs sera mesurée et la croissance des juvéniles sera estimée grâce à des mesures quotidiennement (poids, taille de l'aile et du tarse). Dans le but d'appliquer au mieux la règle des trois R, le nombre d'individus utilisés a été réduit au maximum raisonnable (36 individus/traitement) afin d'avoir une taille d'échantillon et un nombre de répliques suffisant pour pouvoir traiter statistiquement les résultats. Par ailleurs les procédures effectuées (prises de sang, injection de KLH) sont bien connues et induisent une contrainte légère sur les animaux. Enfin les mêmes animaux seront utilisés durant tout le long de l'expérience et ceux-ci seront relâchés dans leur milieu naturel, en accord avec la mairie de Paris.

3599. La transmission synaptique rapide dans le cerveau des mammifères est classifiée dans deux grandes familles: la transmission excitatrice, dont le neurotransmetteur le plus important est le glutamate, qui dépolarise la membrane cellulaire et favorise l'émission des potentiels d'actions, et la transmission inhibitrice, dont les transmetteurs principaux sont le GABA et la glycine. La plupart des neurones du système nerveux centrale reçoit un barrage, variable dans le temps, d'excitation et inhibition dont la balance détermine le profile temporel des potentiels d'actions et la transmission de l'information.

Quelles sont les règles qui déterminent comment inhibition et excitation interagissent au niveau de neurones individuelles? C'est une des questions-clé des neurosciences modernes et bien que plusieurs études aient essayé d'y répondre, beaucoup reste encore à savoir. Nous nous proposons d'étudier les règles d'intégration neuronale de la transmission excitatrice glutamatergique et de l'inhibition GABA/glycinergique dans le cervelet et les noyaux profonds (sa structure de sortie), et dans le thalamus. Pour ce faire il faudra obtenir des informations à plusieurs niveaux, de l'organisation morphologique des structures synaptiques, jusqu'à l'enregistrement de l'activité neuronale à la suite d'un barrage physiologique d'excitation et inhibition. Un ensemble de techniques différentes sera donc utilisé pour disséquer le rapport entre excitation et inhibition: optogénétique, immunohistochimie, électrophysiologie, imagerie calcique, analyse du comportement in-vivo. En particulier, notre projet se basera largement sur les nouvelles techniques d'optogénétique qui ont été récemment développées dans le domaine des neurosciences. L'optogénétique consiste dans l'expression de protéines sensibles à la lumière (Channelrhodopsine 2 et Halorhodopsine), dont la stimulation peut amener soit à l'excitation, soit à l'inhibition de populations neuronales spécifiques. Les stratégies utilisées pour obtenir l'expression spécifique de ces outils sont génétiques, et se basent donc sur l'existence et la disponibilité de modèles transgéniques. Les souris constituent le seul mammifère aisément modifiable génétiquement.

Comme l'on peut donc comprendre la souris sera la seule modèle animale utilisé pour nos études. Un modèle qui, à ce stade, ne peut pas être remplacé, mais seulement complété par des systèmes in silico. La réduction sera possible particulièrement en ce qui concerne les manipulations morphologiques, où un seul animal fournit typiquement un nombre très élevé d'échantillons utilisables pour des buts différents, et en ce qui concerne les manipulations d'optogénétiques in-vivo, où chaque animal peut être soumis à plusieurs tests en parallèle.

La réalisation de ce projet se fera suivant les règles de bonnes pratiques d'expérimentation animale. Tout effort sera donc pris pour réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

Ce projet de recherche nécessitera 3500 animaux.

3600. Au plan biologique il est surprenant de constater que les animaux de grandes tailles (comme les baleines) n'ont pas plus de cancer que les animaux de petites tailles (comme des rongeurs), malgré le fait qu'ils possèdent beaucoup plus de cellules. Ce paradoxe, connu sous le nom de paradoxe de Peto fait l'objet de nombreuses recherches à l'heure actuelle. L'explication la plus vraisemblable considère que les espèces de grandes tailles qui ont pu perdurer sur des temps évolutifs sont aussi celles qui ont été capables de mettre en place dans leur génome des barrières naturelles contre le risque cancéreux. De façon originale, nous proposons d'étudier le paradoxe de Peto au niveau des organes d'une même espèce en répondant aux questions suivantes : les organes de grandes tailles ont-ils, toutes choses étant égales par ailleurs, un risque cancéreux plus élevé que les organes de petites tailles ? si ceci n'est pas le cas, peut on alors détecter (cette fois au niveau de l'expression génique car toutes les cellules ont le même génome) des barrières naturelles contre le cancer ? Cette étude sera menée à partir d'une cohorte de 200 souris. Chaque cage sera équipée de mouse house ainsi que de nest cell, et l'effectif sera limité à 5 animaux par cage.