



**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 (7)

601- La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative touchant le système moteur. Elle se déclare à l'âge adulte et son issue est fatale. Les causes de cette maladie demeurent mystérieuses et il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. La découverte d'un lien génétique dans une petite proportion de patients a néanmoins permis de développer un modèle murin de la SLA par insertion du gène humain FUS muté dans le génome de la souris. S'il est clair que l'introduction du gène muté provoque la maladie, les mécanismes conduisant à la dégénérescence spécifique des neurones moteurs restent quant à eux inconnus. Le but de notre projet est de mettre à profit une nouvelle technique électrophysiologique que nous avons mise au point pour étudier les altérations induites par la mutation dans différentes populations de neurones moteurs spinaux et ainsi établir un scénario physiologique des événements conduisant à la mort neuronale. La compréhension des événements menant à la mort des motoneurones permettra d'aiguiller la recherche vers des cibles thérapeutiques pertinentes.

Le but du présent projet est de caractériser les propriétés électriques des motoneurones spinaux chez une souris génétiquement modifiée (comparée à une souris contrôle). L'une des hypothèses avancées pour rendre compte de la dégénérescence des motoneurones est qu'une hyperexcitabilité entraînerait une élévation du calcium intracellulaire déclenchant des événements conduisant à la mort de la cellule. Notre projet a pour but de tester cette hypothèse. Pour ce faire, les expériences doivent être réalisées chez l'animal adulte juste avant et pendant la période de dégénérescence des jonctions neuromusculaires (entre 30 et 60j).

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum (nous prévoyons d'utiliser 200 souris sur une période de 5 ans). Pour ce faire, nous nous efforçons d'enregistrer plusieurs motoneurones spinaux par animaux (moyenne 2-3 motoneurones/animal) et d'enregistrer le maximum de propriétés électriques dans chaque motoneurone enregistré. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, nous n'utiliserons que des animaux au stade pré-symptomatique, avant que le phénotype ne devienne dommageable, et nous réaliserons les enregistrements intracellulaires de motoneurones lombaires sur des animaux profondément anesthésiés.

Des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire

602- Notre projet de recherche a pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les maladies chroniques développées par les populations inactives physiquement. Notre thématique de recherche se focalise plus particulièrement sur l'insulino-résistance et l'atrophie musculaires qui apparaissent très précocement en réponse à une réduction brutale du niveau d'activité physique. Ces perturbations sont en effet reconnues comme des facteurs favorisant le développement du diabète de type 2, de la fragilité musculaire ou encore de différentes formes de cancer. Pour atteindre ces objectifs, nous avons retenu deux modèles d'inactivité physique. Ces modèles, utilisés chez le rat, apparaissent donc comme complémentaires pour balayer l'ensemble des effets physiologiques de l'inactivité physique au sein du tissu musculaire (i.e. atrophie musculaire, dysfonctions contractiles et insulino-résistance):

- un modèle d'immobilisation des membres inférieurs reproduisant une inactivité musculaire proche de celle observée chez une personne alitée pour diverses raisons médicales (maladies, intervention chirurgicale, fracture). Ce modèle est reconnu comme générant une atrophie musculaire au niveau des membres inférieurs. Il constitue donc un modèle privilégié pour étudier la régulation de la masse musculaire en réponse à l'inactivité physique drastique. Ce modèle peut générer un état de stress et de douleur chez l'animal seulement lors des premiers jours d'expérimentation. La persistance d'un état de stress qui sera jugé par le contrôle de la production de porphyrine autour des yeux et du museau de l'animal servira de point d'arrêt tout comme l'absence de perte de poids.

- le modèle de roue bloquée qui est actuellement le plus proche des niveaux d'inactivité physique observés chez les populations au style de vie sédentaire. Cette approche permet d'induire une brusque réduction de niveau d'activité physique fournissant une fenêtre de temps pour explorer les effets physiologiques à court terme de l'inactivité physique comme le développement de l'insulino-résistance. Il est important de souligner que les animaux conservent une activité ambulatoire dans ce modèle durant la période d'inactivité au contraire du modèle d'immobilisation. Ce modèle génère donc des dysfonctions métaboliques sans pour autant modifier de manière significative la masse musculaire et les

propriétés contractiles musculaires. Ce modèle de roue bloquée n'induit pas de stress particulier, ni de douleur chez l'animal.

32 rats sont prévus pour chacun des protocoles. Les cohortes sont constituées de 8 animaux par groupe (4 groupes : contrôle, inactifs et traités ou non en myriocine) afin d'obtenir un nombre de sujets suffisants pour juger du caractère significatif des résultats. La taille de l'échantillonnage de chaque groupe a été définie à partir d'un test statistique (Sample size test) en considérant une variation de la moyenne de 10% ($\pm 5\%$) du poids des muscles ou de l'insulino-sensibilité entre les 4 différents groupes comme significative (seuil de significativité et une puissance statistique fixée à 0,80). Ces protocoles expérimentaux permettront de mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant précocement dans le muscle en réponse à l'inactivité physique. Ces recherches visent également à établir des moyens de prévention et /ou de traitements (administration de substances pharmacologiques) et peuvent ouvrir des perspectives thérapeutiques.

603- La leptospirose est une maladie bactérienne touchant les personnes ayant un contact rapproché avec les rongeurs sauvages ou l'eau contaminée par leurs urines. Elle touche ainsi par exemple les égoutiers, les pêcheurs ou le personnel de laboratoire dans les pays développés, mais aussi les victimes d'inondations dans les pays plus pauvres. La maladie se caractérise par une phase initiale souvent non spécifique de type syndrome pseudo-grippal. Puis après quelques jours d'évolution une atteinte multiviscérale est possible: atteinte hépatique avec ictère, insuffisance rénale (50 à 70 % des cas), hémorragies (2/3 des cas), méningite (50 % des cas)... La létalité atteint 5 à 20 % sans traitement.

Un vaccin contre *Leptospira interrogans* sérovar *Icterohaemorrhagiae*, groupe le plus pathogène pour l'Homme, existe et est commercialisé. Il est nécessaire de s'assurer de son efficacité dans un modèle animal d'infection par cette bactérie, notamment dans les cas suivants :

- Libération des lots produits pour commercialisation ;
- Vérification de la stabilité tout au long de la période de validité ;
- Evaluation de la biocomparabilité dans le cadre de modifications du processus de production.

Le cobaye et la gerbille sont des modèles couramment utilisés d'infection par *Leptospira interrogans* et le vaccin est connu pour être efficace dans ces espèces. Le principe de ces tests d'efficacité est de vacciner des animaux avec le lot de vaccin à tester (deux injections à 7 jours d'intervalle). Deux semaines après la deuxième injection deux procédures sont envisageables :

- Les animaux peuvent être infectés expérimentalement par la bactérie. Leur taux de mortalité est alors comparé à celui d'animaux non vaccinés et infectés ;
- Les animaux peuvent subir un prélèvement sanguin, dans lequel sont dosés les anticorps dirigés contre la bactérie. La présence de ces anticorps témoigne en partie de l'efficacité du vaccin.

Durant les cinq années du projet, un total de 720 gerbilles et 360 cobayes devrait participer à ces procédures.

604- La réponse immunitaire anti -infectieuse consiste à amener, au bon moment et au bon endroit, les cellules capables de répondre à une agression afin de limiter celle-ci. Une étude dynamique de la réponse immunitaire, grâce notamment à la microscopie intra-vitale sur l'animal vivant permettra de mieux en comprendre l'organisation spatio-temporelle et d'identifier les acteurs de la réponse immunitaire face à diverses agressions. La microscopie intravitale consiste à observer durant quelques heures, suite à une légère chirurgie, et un laser dont la toxicité est indétectable, les cellules dans leur environnement, alors que l'animal est simplement endormi. La souris est un modèle de choix car son système immunitaire partage de nombreux éléments structurels et fonctionnels avec celui de l'homme.

Notre approche se compose de trois parties distinctes.

1) Dans un premier temps, nous étudierons des souris déficientes pour certains gènes auxquelles nous inoculerons différents microbes invasifs ou des agonistes induisant des processus inflammatoires aigus. L'étude de la réponse immunitaire induite par ces agents dans les souris déficientes nous permettra de cibler quels gènes et quelles cellules sont importants pour que la réponse immunitaire adéquate se mette en place.

2) Après inoculation de l'un ou l'autre agent, nous ferons ensuite des cinétiques permettant de déterminer la fenêtre temporelle optimale grâce à la cytométrie en flux. 3) Enfin nous visualiserons la réponse immunitaire sur l'animal vivant par microscopie intra-vitale biphotonique.

Il est important de souligner que les expériences d'imagerie permettent d'obtenir de multiples données pendant chaque acquisition. Le nombre de souris nécessaires pour obtenir des données statistiquement significatives est donc limité. En plus, nous aurons la possibilité de planifier des expériences *in vitro* qui confirmeront et valideront les données obtenues *in vivo*. Toutes ces démarches permettront de réduire au minimum le nombre des souris utilisées et d'utiliser, pour nos données expérimentales, des méthodes d'analyse statistique comme le test t, celui de Student ou celui de Mann et Whitney. Le nombre estimé de souris auxquelles nous aurons recours et qui seront mises à mort, pendant la période de 5ans, est de N = 4000, un nombre qui devrait se traduire par l'obtention de résultats solidement étayés.

Les protocoles seront définis standardisés et optimisés afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées.

605- Le foie est un organe de détoxification des nutriments et des xénobiotiques, mais représente également un site privilégié de tolérance immunitaire des lymphocytes T vis à vis d'antigènes (Ag) intestinaux, d'origine alimentaire ou dérivés de la flore commensale, drainés depuis la lamina propria du grêle via la veine porte. A l'homéostasie, le microenvironnement hépatique est riche en cytokines à fonction suppressive (IL-10, TGFβ) et en acide rétinolique, produits par les hépatocytes. Ces facteurs sont essentiels non seulement à la tolérance immunitaire (néo-conversion de lymphocytes T régulateurs Foxp3+ à partir de LT CD4+) mais aussi à la différenciation et la survie des plasmocytes (PC) à immunoglobulines A (IgA).

Les IgA constituent la classe d'immunoglobuline la plus abondante de l'organisme et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale (maintien de la flore, neutralisation des pathogènes). L'activation, la prolifération des LB et la commutation isotypique vers IgA sont initiées principalement dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou GAL T (Plaques de Peyer) et mettent en jeu des sous-populations de cellules dendritiques et des facteurs (IL 10, TGFβ, acide rétinolique) également impliqués dans la tolérance orale.

Capitalisant sur des données assez anciennes de la littérature et nos résultats récents, nous formulons l'hypothèse qu'à l'instar de son rôle dans la tolérance orale, le foie est susceptible de constituer un site important d'induction et/ou d'amplification et/ou de survie des PC à IgA. Ces IgA pourraient être dirigées à la fois contre des Ag d'origine intestinale (portés par la flore ou des pathogènes) ou contre des Ag véhiculés par le sang et rejoignant le foie via l'artère hépatique. Cette étude devrait permettre d'éclaircir les mécanismes fondamentaux liés à la présence des acteurs de la réponse IgA au niveau du foie à l'état d'homéostasie, et d'en comprendre l'impact sur la protection intestinale et/ou locale. Les informations recueillies devraient être d'un intérêt majeur pour la recherche de voies et de méthodes de vaccination efficaces pour produire une réponse IgA capable de protéger contre des agents infectieux, au niveau des muqueuses et au niveau systémique.

Toutes les précautions seront adoptées tout au long de la procédure expérimentale afin de ne pas entraîner de souffrance pour les animaux, et le nombre total de souris (24 animaux) a été fixé à minima afin de permettre une interprétation statistique des résultats.

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

Les avantages associés à l'utilisation du lipiodol dans la chimioembolisation sont largement reconnus et ont conduit, depuis 25 ans, à de nombreuses études précliniques et cliniques. Le Lipiodol continue de nos jours à susciter un vif intérêt grâce à des propriétés physico-chimiques uniques qui lui confèrent des atouts majeurs face à un arsenal concurrentiel émergent. Aujourd'hui la chimioembolisation est recommandée avec un niveau de preuve 1A par rapport aux BSC (best supportive care), et elle est classiquement utilisée comme gold standard dans les études comparatives des procédures concurrentes (chimioembolisation avec billes chargées (DEB) ; embolisation seule...).

Telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui, la chimioembolisation souffre d'être une technique liée à l'hétérogénéité des pratiques hospitalières qui en limite l'efficacité – la procédure d'émulsification étant opérateur- et centre-dépendant :

- type d'émulsion
- nature et dose de la drogue,
- nature de l'agent d'embolisation
- timing d'injection
- sélectivité
- nombre et rythme des cures etc.....

Aucune conclusion robuste ne peut être tirée sur des points très importants tels que le type et la taille des émulsions: les caractéristiques de l'émulsion idéale pour la chimioembolisation ne sont pas vraiment déterminées. Il paraît évident que de nouvelles études sont nécessaires, dans lesquelles le comportement in vivo de différents types d'émulsions correctement caractérisées sera rigoureusement étudié et permettra d'apporter des éléments scientifiques aux cliniciens dans leur pratique.

Différents modèles existent et sont reconnus dans la pathologie du cancer hépatique. Parmi cela on peut citer le modèle rat N1S1 et modèle de lapin portant une tumeur VX2 (le plus utilisé) orthotopique (hépatocarcinome, HCC). Ces modèles sont utilisés et recommandés dans les expérimentations de radiologie interventionnelle pour reproduire la chimioembolisation telle que pratiquée en clinique et sur lesquels la majorité des thérapeutiques sont évalués.

L'expérience du centre expérimental ainsi que les compétences et expériences des intervenants dans ces différentes procédures et en expérimentation animale garantissent une prise en charge optimale du bien-être de l'animal.

Le présent projet nécessitera l'utilisation de 450 rats et 130 lapins.

607- Le stress oxydant et les modifications oxydatives des protéines sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que le vieillissement cellulaire, les pathologies neurologiques, le diabète de type 2, l'obésité et les maladies cardiovasculaires. Le phénomène de glycation des protéines constitue une source de stress oxydant retrouvée accrue chez des patients atteints de syndrome métabolique.

Les premières protéines touchées sont les protéines plasmatiques comme notamment l'albumine qui représente la protéine circulante la plus abondante du plasma.

L'albumine est une protéine essentielle au fonctionnement de l'organisme. Une baisse de l'albuminémie est associée à une hausse de la mortalité et les activités antioxydantes de la protéine permettent d'expliquer son rôle protecteur.

Grâce à des modèles in vitro de cultures cellulaires telles que macrophage et adipocyte, nous avons mis en évidence l'influence de la glycation de l'albumine sur sa structure et ses propriétés biologiques. Nos travaux ont montré que les cellules en contact avec l'albumine glyquée subissaient un stress oxydant via la surproduction de radicaux superoxydes au niveau de l'enzyme NAD(P)H oxydase et mitochondrial. Les modifications oxydatives des protéines en particulier, résultant de ce stress oxydant accru, sont maintenant bien reconnues dans la progression des désordres inhérents à la pathologie diabétique.

Nous souhaitons ici faire évoluer notre recherche par l'utilisation d'un modèle connu de souris diabétique afin de continuer d'établir le lien entre la glycation de l'albumine et son impact sur le stress oxydant subi par l'organisme. La souris génétiquement modifiée db/db porte une mutation récessive au niveau du gène du récepteur de la leptine induisant un développement rapide de la pathologie diabétique et de l'obésité. Elle est un modèle de choix pour les études in vivo portant sur le syndrome métabolique. Ce projet propose d'étudier le modèle db/db et de suivre la progression du diabète et de l'obésité sur une période de 8 semaines (début d'étude à l'âge de 4 semaines et fin d'étude à 12 semaines) en mesurant hebdomadairement le poids ainsi que la glycémie à jeun toutes les deux semaines. Les souris obèses et diabétiques de génotype db/db sont comparées aux souris contrôles non diabétiques et de poids normal de génotypes db/+ et +/+. Dès que les animaux atteignent l'âge de 12 semaines, un prélèvement sanguin terminal ainsi que la collection des organes tels que tissu adipeux, foie, rein et cerveau serviront à réaliser des études histologiques, biochimiques et moléculaires afin de déterminer l'impact du diabète et de l'obésité sur la glycation des protéines plasmatiques et d'avoir une vue d'ensemble sur le stress oxydant subi par ces organes.

Ce projet sera mené sur 45 souris mâles au total en répartissant les animaux sur 3 études indépendantes de 15 mâles (5 animaux par génotype) afin de pouvoir collecter et comparer des données avec un pouvoir statistique suffisant pour générer des conclusions. Les souris db/db mâles sont choisies dans un premier temps en référence à des études montrant qu'elles ont une glycémie généralement supérieure à celle des femelles ainsi maximisant le phénomène de glycation des protéines que ce projet propose d'étudier.

608- Les encéphalites NMDA (méthyl D-aspartate) constituent un ensemble d'atteintes du système nerveux caractérisées par des troubles moteurs et comportementaux. La cause de ces symptômes a récemment été identifiée. Il s'agit de la production par le patient d'anticorps anti-NMDA reconnaissant les récepteurs ionotropiques au NMOA du cerveau. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreuses fonctions dont la mémoire et sont particulièrement important dans les mécanismes de plasticité synaptique ou ils permettent de renforcer certaines synapses. La nociception (perception de la douleur) repose également sur la présence de ; synapses contenant des récepteurs NMDA au niveau de la moelle. Les troubles de perception de la douleur tels que les douleurs chroniques mettent en jeu des mécanismes de plasticité synaptique identiques à ceux de la mémoire et nécessite la présence de récepteurs NMDA pour se mettre en place. L'objectif de notre étude consiste à mieux comprendre les altérations de la signalisation NMDA et ses répercussions sur la perception de la douleur. Elle nous permettra à terme, si notre hypothèse est validée, de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les encéphalites et d'ajouter un symptôme à la liste de ceux déjà répertoriés et permettant ainsi de mieux diagnostiquer les encéphalites NMDA. Ces expérimentations se dérouleront en veillant à respecter la règle des trois R c'est pourquoi nous commencerons par des expériences pilotes qui si elles ne sont pas concluante mettrons fin à ce projet. D'autre part une large partie de ces expériences se feront in vitro sur un modèle de tranche aigue d'hippocampe pour limiter la souffrance animale. Au total ce projet nécessitera au maximum 160 souris.

609- Les mélanocytes sont des cellules spécialisées dans la production de pigments et colonisent de nombreux tissus au sein de l'organisme comme la peau et les follicules pileux. Les mélanomes cutanés sont des tumeurs provenant de la transformation de ces mélanocytes épidermiques ou folliculaires. Le mélanome est l'un des cancers les plus agressifs, connu pour sa grande résistance à la plupart des traitements actuels (chimio- et radiothérapie) et les patients atteints, dont le nombre est en augmentation croissante, ont une durée de survie moyenne d'un an après diagnostic. En effet, compte tenu de l'évolution rapide du mélanome et de sa capacité importante à former des métastases, un diagnostic précoce et une ablation chirurgicale des tumeurs primaires en phase de croissance dans les couches superficielles de la peau reste le moyen le plus efficace de soigner cette pathologie. Une fois que la tumeur s'est engagée dans une phase de croissance verticale (invasion), elle peut atteindre le système sanguin ou lymphatique propice à la dispersion des métastases dans l'organisme et le mélanome devient difficile à soigner.

Pour permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées contre cette pathologie, il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'apparition et de développement des tumeurs et les propriétés des métastases. Pour cela, nous nous intéressons aux caractéristiques d'un acteur clé jouant un rôle à la fois dans le développement embryonnaire, le fonctionnement normal des mélanocytes et dans le développement du mélanome : MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor).

De nombreuses études se sont penchées sur le rôle intrinsèque du facteur MITF (comment MITF est produit et comment il agit sur l'expression des gènes) mais très peu sur la façon dont il est lui-même régulé en terme d'activité et de stabilité. Des analyses préalables in vitro à partir de cellules de mélanome en culture nous ont permis d'identifier des partenaires de MITF, dont USP11 (ubiquitin specific peptidase 11). Nous avons observé in vitro que la perte d'USP11 entraînait un arrêt de la prolifération spécifiquement dans les cellules de mélanome en culture alors qu'elle reste sans effet sur d'autres types cellulaires non-mélanome testés, appuyant l'existence d'un rôle spécifique pour ce facteur dans le lignage mélanocytaire. Nous souhaitons maintenant étudier l'effet de la perte d'USP11 sur le développement des mélanocytes au cours de l'embryogenèse, puis sur les étapes d'initiation et le cas échéant de développement du mélanome. L'ensemble du projet devrait nécessiter environ 800 souris, la plupart étant produites pour obtenir les souris expérimentales avec le génotype nécessaire, soit environ 650 souris. En fonction des génotypes obtenus, ce nombre pourra être réduit fortement. Le nombre de souris nécessaires à des fins d'expérimentation est d'environ 150, mais est incompressible du fait de la nécessité de résultats statistiques et de la prise en compte de l'ensemble des contrôles. Les procédures expérimentales susceptibles d'entraîner une douleur, la souffrance ou une angoisse pour l'animal sont réalisées sous anesthésie et sont toutes accompagnées d'un traitement analgésique. Un animal n'est pas gardé en vie à l'issue d'une procédure s'il est susceptible de continuer à éprouver une douleur, souffrance ou angoisse qui ne peut pas être soulagée.

610- L'objectif des protocoles d'immunisation rats est la production d'anticorps polyclonaux, qui sont utilisés à des fins scientifiques et médicales (exemple : applications en recherche in vitro, fabrications de tests de diagnostics ou de produits pharmaceutiques...).

L'utilisation de rats donne une production de faibles volumes d'anticorps mais permet la production d'IgE ou d'anticorps de spécificité restreinte pour les protéines de souris.

Le nombre d'animaux prévu pour ces protocoles est d'environ 100 par an.

La production d'anticorps polyclonaux sur rats est réalisée par administration d'antigène accompagné ou non d'adjuvant, puis récolte du sang, sérum, plasma ou organes des animaux pour envoi au client qui pourra réaliser la purification et l'extraction des anticorps d'intérêt.

Nos clients s'engagent à nous sous-traiter des productions d'anticorps polyclonaux ne pouvant être réalisées in vitro dans l'état de l'art, ainsi qu'à utiliser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à la quantité d'anticorps désirée.

611- Notre programme de travail repose sur l'observation fondamentale que les récepteurs de chimiokines sont impliqués dans le recrutement et l'activation des leucocytes intervenant dans de nombreuses pathologies inflammatoires et en particulier le cancer. Ce programme de recherche implique des études in vivo reposant sur l'utilisation de différents modèles précliniques focalisés sur des modèles pathologiques murins qui consisteront à

1) Reproduire la pathologie :

i) Par injection de différents agents inflammatoires.

ii) Par inoculation de lignées cellulaires tumorales

iii) Par utilisation de souris génétiquement modifiées qui développent spontanément la pathologie.

2) Examiner les phénomènes migratoires lors de la réponse immune, grâce à une collection des souris génétiquement modifiées (souris transgénique, Knock-out et Knock-in) ou par l'utilisation d'outils à visée thérapeutique comme des analogues pharmacologiques à longue durée de vie in vivo. Les approches technologiques mise en œuvres mises à profit ici seront essentiellement des techniques de fluorescence in vivo, sur coupe histologique par microscopie et sur suspensions cellulaires issues d'organes par cytométrie de flux, permettant de répondre à un grand ensemble de questions à partir du même animal.

Ce programme de recherche est développé dans le respect de la règle des 3R. Il est tiré profit de chaque animal pour nous apporter le maximum d'information. Si possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles afin de réduire le nombre d'animaux. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupe contrôles. Très souvent nous utilisons des lignées cellulaires transformées et de l'expérimentation in vitro pour remplacer les études sur cellules primaires. Et enfin nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance animale ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Considérant l'ensemble de ces procédures appliquées sur la diversité des protocoles expérimentaux et la nécessité de mise en accouplement, le nombre d'animaux utilisés représente autour de 1700 souris /an.

612- La colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique (RCH) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) qui affecte l'extrémité distale du tube digestif, côlon et rectum. La colite ulcéreuse se classe parmi les maladies inflammatoires parce qu'elle occasionne une inflammation, des plaies, des saignements et une fibrose sur les parois internes du côlon. L'inflammation débute habituellement près du rectum et gagne ensuite l'intérieur du côlon.

L'inflammation se manifeste sur des régions adjacentes plutôt que sur de petits segments.

La colite ulcéreuse est une maladie auto-immune, c'est-à-dire qu'elle est causée par un dérèglement du système immunitaire qui s'attaque à ses propres cellules. Les causes de la colite ulcéreuse sont toutefois mal connues. Les scientifiques pensent que l'inflammation de la muqueuse colorectale est causée par une réaction immunitaire excessive de l'organisme contre des virus ou des bactéries présents dans l'intestin. Selon l'hypothèse la plus probable, cette réaction

auto-immune serait dirigée contre les bactéries « inoffensives » normalement présentes dans le tube digestif (la flore intestinale).

L'inflammation s'accompagne de la formation d'ulcères pouvant saigner et produire du mucus ou du pus. Les personnes atteintes de colite ulcéreuse doivent être attentives au risque d'anémie car lorsque la maladie est grave, les pertes de sang peuvent être abondantes, pertes que l'on peut compenser grâce à des suppléments en fer. Des facteurs génétiques et environnementaux influenceraient l'apparition de cette maladie. Le stress et les intolérances alimentaires peuvent déclencher les symptômes chez certaines personnes, mais ces facteurs ne seraient pas à l'origine de la maladie.

La colite ulcéreuse est une affection imprévisible, caractérisée par des rechutes ou poussées suivies de rémissions. Il est impossible de prévoir la survenue d'une poussée. Pendant une poussée, les personnes atteintes peuvent avoir une diarrhée sanglante, des crampes d'estomac et une perte de poids. Il se peut également qu'elles soient dans l'incapacité d'accomplir des tâches habituelles, voire même qu'elles aient besoin de se faire hospitaliser. La colite ulcéreuse peut également augmenter le risque de cancer colorectal. Les personnes atteintes de colite ulcéreuse doivent faire effectuer régulièrement une coloscopie de dépistage.

Enfin, plusieurs complications liées à l'usage à long terme de certains médicaments, comme les corticostéroïdes ou les immunosuppresseurs, peuvent survenir. Ainsi, l'usage des corticostéroïdes sur de longues périodes rend plus à risque d'ostéoporose, de cataracte, d'hypertension, de diabète de type 2... Les corticoïdes et les immunosuppresseurs peuvent aussi augmenter le risque d'infection.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de l'extrait naturel HINQ2 ayant des propriétés anti-inflammatoires par rapport à un traitement médicamenteux aux effets reconnus sur la colite ulcéreuse. Dans ce but, 48 rats mâles adultes Wistar seront utilisés, répartis en 6 groupes de 8 animaux chacun. Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, ces animaux seront soumis à l'induction d'une ulcération colique et les traitements auront lieu quotidiennement par voie orale 24 heures après l'induction de cette pathologie pendant 8 jours.

613- La maladie humaine due à des mutations du gène COL3A1 codant le collagène de type III, constituant de la paroi artérielle, est le syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire. Il se caractérise par une fragilité des parois vasculaires engendrant des ruptures artérielles spontanées dès 20 ans et un décès avant 50 ans chez la moitié des patients. L'évaluation des différentes stratégies thérapeutiques actuellement à l'étude nécessite entre autre de déterminer la rigidité artérielle des artères, propriété biomécanique qui peut-être évaluée par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). Celle-ci se propage le long de la paroi artérielle suite à l'ouverture des valvules aortiques d'autant plus rapidement que l'artère est rigide. Pour évaluer la VOP, il suffit de mesurer la pression à deux endroits différents de l'artère et d'estimer le temps entre les deux pressions mesurées. Chez l'homme plusieurs systèmes échographiques permettent d'évaluer cette VOP entre l'artère carotidienne et l'artère fémorale, et des rigidités supérieure (hypertension, diabète) ou inférieure (maladies génétiques) peuvent être retrouvées de façon reproductible. Sur les petits animaux, c'est plus difficile. Les techniques non invasives existant ne permettent que l'estimation de la rigidité d'un long segment artériel. Une estimation de l'élasticité d'une artère chez les petits animaux est réalisable qu'à travers l'utilisation de technique d'imagerie comme l'angiIRM ou la pose de cathéters de manière invasive. Soit la technique est longue et coûteuse (AngioIRM), soit elle est invasive (pose de cathéters).

Ce projet de recherche se propose de tester un nouvel outil ultrasonore, l'UltraFastEcho, qui permet d'acquérir jusqu'à 10 000 images par seconde et ainsi de visualiser le déplacement de l'onde de pouls le long de la paroi artérielle et d'en mesurer sa vitesse. Cette technique non invasive et rapide permettrait d'étudier la VOP aortique chez le petit animal, rapidement et simplement.

Nous avons choisi de tester dans un premier temps l'UltraFastEcho chez 20 Rats (*Rattus norvegicus*) hypertendu (SHR) ou non, en comparaison avec la VOP mesurée par cathéters. La rigidité artérielle étant supérieure chez le rat SHR, la VOP est attendue plus élevée. Dans un deuxième temps, nous testerons l'UltraFastEcho chez 60 Souris (*Mus musculus*) haploinsuffisantes ou non pour le collagène III, modèle murin de la pathologie d'Ehlers Danlos, en mesurant la pression artérielle par cathéter carotidien. La rigidité est attendue moindre chez les souris atteintes, donc une VOP plus basse. Ce projet de recherche vise à établir la validité de ce nouvel outil de mesure de la rigidité artérielle, outil non invasif, chez le petit animal, avec application à 2 modèles pathologiques. Pour cela la comparaison à la technique de référence (par cathéters) expose à des complications chirurgicales lors des expérimentations, justifiant ainsi l'effectif, celui-ci devant être suffisamment grand pour valider statistiquement les résultats obtenus. Enfin, il existe un modèle de souris déficientes en collagène III, mais pas de modèle de souris hypertendues, d'où le recours aux rats.

614- L'hème oxygénase (HO-1) est un inducteur d'une protéine de stress qui génère la libération du monoxyde de carbone (CO) et de la biliverdine qui est transformée en bilirubine. Ces derniers ont un important rôle d'antioxydants endogènes. Le CO est bien reconnu comme médiateur intracellulaire qui a plusieurs activités pharmacologiques. A savoir, des activités vasodilatatrice, anti-ischémique et anti-inflammatoire. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la voie de l'HO-1 dans l'induction et l'augmentation de la production du CO. Ainsi cette surproduction du CO est responsable de la restauration de l'homéostasie cellulaire dans des conditions pathologiques. De ce fait, il paraît fort intéressant d'exploiter cette voie dans des applications thérapeutiques.

Dans ce contexte, une nouvelle génération de molécules chimiques de synthèse (« carbon monoxide-releasing molecules » ou CO-RMs) a été développée et permet le contrôle et l'apport du CO exogène aux cellules. Par voie de conséquence cette génération de molécules présente une action cyto-protectrice.

Les résultats encourageants de nos études concernant l'effet protecteur de ces CO-RMs dans diverses maladies comme l'infarctus du myocarde, l'inflammation et la dysfonction vasculaire convergent vers la mise en évidence de l'important rôle du CO dans le contrôle du métabolisme cellulaire, l'angiogenèse et de manière générale dans les maladies liées au métabolisme tissulaire.

Afin d'optimiser et d'augmenter le potentiel protecteur des CO-RMs, nous avons réussi la synthèse d'une nouvelle classe d'hybrides de molécules capables de délivrer du CO exogène qui à son tour permet d'augmenter, simultanément, la libération du CO et de la biliverdine endogènes via l'induction de la voie HO-1.

Le but de notre projet est (i) d'évaluer in vivo l'effet de cette nouvelle génération de molécules hybrides sur l'induction de la voie HO-1 et la libération du CO dans différents organes ; (ii) de tester leur effet thérapeutique dans le modèle de cicatrisation de la peau chez les diabétiques. Pour ce projet on utilisera 2270 souris.

615- Les gangliosides sont des glycolipides (lipides sucrés) particulièrement abondants dans le cerveau et le tissu nerveux des animaux. Ils jouent un rôle majeur dans le fonctionnement et le maintien de l'intégrité du système nerveux. Des désordres du métabolisme des gangliosides sont en effet à l'origine de dysfonctionnements neurologiques graves chez l'homme.

Les souris transgéniques déficientes en gangliosides sont des outils uniques qui permettent, depuis une quinzaine d'années, de préciser ce rôle majeur des gangliosides dans les tissus nerveux tout au long de la vie. Il s'agit notamment de deux modèles invalidés pour des enzymes de biosynthèse des gangliosides (GM2/GD2 synthase et GD3 synthase) ainsi que du modèle issu du croisement des deux précédents. Il a été montré que ces animaux présentent un certain nombre de dysfonctionnements nerveux dont la nature et la gravité dépendent du modèle et de l'âge: troubles moteurs, diminution de sensibilité, baisse des capacités de régénération après dommages des nerfs...

La structure et la fonction de la rétine n'ont pas encore été étudiées chez ces modèles murins. Pourtant, la rétine, tissu majeur de la vision, est un prolongement direct du système nerveux central. Il est donc fort probable que ce tissu présente des altérations chez ces animaux. L'objectif du présent projet est d'étudier la structure et la fonction rétinienne dans ces modèles de souris transgéniques déficientes en gangliosides à différents âges ainsi qu'à l'état basal ou suite à un stress de la rétine (modèle de glaucome et modèle de DMLA). L'effet de l'administration de gangliosides (par administration orale ou pompe osmotique) sera également étudié. La fonction rétinienne sera évaluée par électrorétinographie sur animaux anesthésiés. La structure de la rétine sera ensuite examinée par angiographie puis par des techniques d'histologie après sacrifice des animaux et dissection de la rétine. Ces procédures, pratiquées en routine dans notre laboratoire, seront réalisées dans des conditions optimales.

A la lumière des travaux publiés sur ces mêmes modèles murins ainsi que de la variabilité observée dans notre laboratoire pour les procédures d'exploration rétinienne, nous envisageons d'utiliser 6 individus par groupes (homozygotes -/- et +/-). Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet de 5 ans a été estimé, dans le respect des règles de réduction, à 432. Des anesthésiques et analgésiques adéquats seront utilisés pour toute procédure risquant d'induire une douleur des animaux. Ceux-ci seront manipulés avec précaution et dans le souci de réduire au maximum leur stress et souffrance. Les points limites clairement définis conduiront au sacrifice des animaux au cas où les souffrances ne pourraient être soulagées.

Ces travaux permettront de clarifier le rôle, encore mal connu, des gangliosides dans la structure et la fonction de la rétine, en particulier de sa composante nerveuse. Ils permettront ainsi de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de maladies neurodégénératives de la rétine, comme le glaucome ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge, voire d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques, via les gangliosides, pour ces maladies dont les traitements sont, à ce jour, peu satisfaisants.

616- L'étude des réponses comportementales aversives à des stimuli olfactifs présentent un intérêt majeur dans la perspective de luttres contre les rongeurs domestiques. Différentes substances, principalement issues de prédateurs ont dès à présent été identifiées comme engendrant des réponses d'évitement. Les effets de ces substances sont généralement évalués sur la base de temps d'investigation de la source odorante répulsive, des latences de contact avec la source odorante ou de son évitement. Toutefois, ces substances ne pourraient avoir « in situ » de réels effets d'évitement que si elles engendrent chez l'animal un désagrément tel qu'elles le conduisent à éviter la zone odorisée de manière relativement pérenne. En outre, l'emploi d'odeurs issues de prédateurs devrait produire chez l'animal un état de stress le conduisant à modifier son profil comportemental. Notre projet de recherche vise donc à évaluer et comparer les réponses comportementales de souris d'origine sauvage à différents stimuli odorants aversif dans un contexte expérimental plus proche des conditions « in situ » que celles généralement pratiquées. Le comportement des animaux sera évalué sur plusieurs heures afin de mettre en évidence, non seulement des différences de temps d'investigation de la source olfactive mais également son évitement. Le stress des animaux sera évalué d'une part par les profils comportementaux des animaux (activité, comportements auto-centrés, freezing, position des oreilles lors du flairage) et par thermographie infrarouge

sensée révéler une moindre production thermique au niveau de certaines zones périphériques de l'animal (queue, pattes, oreilles...). Un effectif total de 24 animaux (souris domestiques mâles) est prévu pour cette étude.

617- Notre équipe s'intéresse aux mécanismes de codage des odeurs et aux processus de plasticité ayant lieu dans le système olfactif. Notre but est de comprendre comment le système olfactif peut détecter et discriminer de nombreuses odeurs de l'environnement, et en particulier comment le système olfactif peut s'adapter à des variations des conditions environnementales ou physiologiques, ce qui est peu connu pour le moment.

Nous nous focalisons sur les neurones olfactifs primaires, première étape de la perception olfactive. Ces neurones sont responsables de la détection des molécules chimiques, de la transformation d'une information chimique en information électrique ensuite envoyée au cerveau. Ils sont les premiers neurones (avec les neurones visuels) impliqués dans la prise alimentaire. Des relations réciproques entre nutrition et olfaction ont été montrées au niveau comportemental mais les mécanismes physiologiques sont encore méconnus.

Nous souhaitons dans ce projet étudier d'une part, l'impact du statut nutritionnel (animal à jeun ou rassasié) sur la détection des odeurs par les neurones olfactifs et d'autre part, l'impact de régimes alimentaires délétères (riches en sucres et/ou graisse) sur ces mêmes neurones olfactifs.

Pour répondre à cette question, nous utilisons des modèles de souris génétiquement modifiées dans lesquelles la protéine fluorescente GFP est insérée dans des neurones olfactifs exprimant un récepteur connu et dont on connaît le ligand. Nous avons sélectionné pour cette étude un type de neurone généraliste (répondant à un grand nombre d'odeurs) et un type de neurone spécialiste (dont un seul ligand a été décrit). Nous étudierons les propriétés anatomiques, moléculaires, physiologiques de ces neurones en fonction du statut nutritionnel ou du régime alimentaire suivi. Ce projet nécessite l'utilisation de 830 souris transgéniques.

618- La formation du tissu osseux par les ostéoblastes, les cellules ostéoformatrices, est contrôlée par de nombreux facteurs tels que les hormones sexuelles. Il a été montré que d'autres molécules appelées microARNs, régulent également l'activité des ostéoblastes.

Nous avons identifié au laboratoire un microARNs (miR-199a/b-5p) comme un régulateur positif de la formation osseuse. Ce microARN augmente la capacité des cellules osseuses à synthétiser une nouvelle matrice osseuse en culture. Par ailleurs, un autre laboratoire a montré en 2008 que l'absence de ce microARNs dans tous les organes chez la souris réduit la formation osseuse et le développement du squelette.

L'homéostasie osseuse dépend de l'interaction entre différents types cellulaires et est régulée par un système hormonal complexe que les études en culture cellulaires sont incapables de mimer. L'objectif principal de notre étude sera de confirmer la capacité de ce microARN à augmenter la formation osseuse chez la souris in vivo. Nous allons développer un nouveau modèle de souris dans lequel l'expression de notre microARNs sera augmentée dans les ostéoblastes. Il s'agit d'une modification ciblée qui n'entraînera aucune modification dommageable chez l'animal. En augmentant la synthèse de ce microARN dans l'ostéoblaste, nous attendons une augmentation modérée de la formation osseuse. Dans des conditions physiologiques aussi bien que dans des situations de perte osseuse (souris âgée par exemple), ce microARN devrait contribuer à maintenir la formation osseuse constante et donc à améliorer les propriétés mécaniques du tissu osseux au cours du temps (résistance aux chocs).

Ce modèle unique nous permettra de valider à la fois les résultats que nous avons obtenus avec les cellules en culture in vitro et de montrer que ce microARN est capable de prévenir la perte osseuse liée à l'âge ou liée à la ménopause. Les différents paramètres du tissu osseux (densité, microstructure...) seront évalués au cours du temps (souris jeune, adulte et au cours du vieillissement) et après la ménopause induite par ovariectomie en utilisant des approches classiques. L'étude du tissu nécessite la mise à mort de l'animal car le prélèvement in vivo chez la souris serait dommageable pour l'animal et douloureux. Nous utiliserons 238 souris maximum pour l'ensemble de cette étude qui s'étendra sur 5 ans.

Notre projet s'inscrit également dans le cadre de l'application des microARNs dans le domaine de la thérapie. Le miR-199a/b-5p pourrait avoir une application thérapeutique potentielle dans le cadre des pertes osseuses associées aux pathologies telles que l'ostéoporose.

619- Le but de ce projet est d'élucider les mécanismes à l'origine des effets anorexigènes de la nesfatine-1. De nombreux travaux de la littérature indiquent que cette substance découverte en 2006, réduit la prise alimentaire en mettant en jeu des voies de signalisation indépendantes de la leptine (autre substance anorexigène bien connue). Dans le cadre de la thématique «comportement alimentaire » du laboratoire, notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années à la déglutition. Nous avons en effet mis au point chez le rat anesthésié, un protocole expérimental permettant : i) de déclencher des déglutitions rythmiques en stimulant le nerf laryngé supérieur ou le tractus solitaire au niveau du bulbe rachidien, ii) de tester les effets de différentes substances injectées dans le centre programmeur central de la déglutiteur bulbaire sur la fréquence de ces déglutitions. L'expérimentation chez l'animal est incontournable pour la réalisation de ce protocole. En effet, aucune étude in vitro ne peut permettre à la fois d'enregistrer les décharges déglutitrices et d'injecter au niveau du générateur central de la déglutition (localisé dans le bulbe rachidien) les substances testées.

Dans ce projet, nous nous proposons d'étudier les effets de la nesfatine-1 sur le réflexe déglutiteur afin de préciser l'implication de la déglutition, séquence motrice essentielle au processus d'ingestion, dans les mécanismes d'action de

cette substance anorexigène. Les effets de la nesfatine-1 sur la déglutition seront étudiés à différentes doses afin d'établir des courbes dose-réponse. Nous étudierons également les effets de peptides de synthèse correspondant au site actif de la nesfatine afin d'affiner la compréhension des mécanismes d'action de cette substance. Cette étude devrait nécessiter au maximum un lot de 50 rats. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous procéderons à l'analyse régulière de nos données expérimentales.

L'enregistrement des paramètres physiologiques, les rythmes respiratoire et cardiaque, ainsi que la température corporelle nous permettra d'assurer un bon niveau d'anesthésie afin d'éviter toute douleur. Le mélange anesthésique utilisé assure à la fois l'analgésie, la sédation et la myorelaxation.

620- Le but de ce projet est de déterminer si le DON (déoxynivalénol) exerce une action directe sur le système nerveux central. Les mycotoxines sont des composés produits par certains champignons microscopiques dont les plus fréquentes sont les toxines de type DON. Celles-ci entraînent des vomissements, inflammations de la peau et troubles nerveux. Les animaux et les hommes peuvent être contaminés par voie aérienne et par voie alimentaire par les mycotoxines qui sont des métabolites présentant une action toxique à faible dose. Dans le cadre de la thématique « comportement alimentaire » du laboratoire, une étude réalisée chez la souris, montre que le DON exerce un effet anorexigène et laisse suspecter une action au niveau du système nerveux central. Afin de préciser par quels mécanismes cet effet s'exerce, nous nous proposons d'utiliser le modèle déglutition. Nous avons en effet mis au point chez le rat anesthésié un protocole expérimental permettant : i) de déclencher des déglutitions rythmiques en stimulant le nerf laryngé supérieur, ii) de tester les effets de différentes substances injectées dans le centre déglutiteur bulbaire sur la fréquence de ces déglutitions. L'expérimentation chez l'animal est incontournable pour la réalisation de ce protocole, en effet aucune étude in vitro ne peut permettre à la fois d'enregistrer les décharges déglutitrices et d'injecter au niveau du bulbe rachidien les substances testées.

Dans ce projet, nous nous proposons de tester les effets du DON sur le réflexe déglutiteur, séquence motrice essentielle au processus d'ingestion. Les effets du DON sur la déglutition seront étudiés à différentes doses afin d'établir des courbes dose-réponse. Cette étude devrait nécessiter au maximum un lot de 50 rats. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous procéderons à l'analyse régulière de nos données expérimentales.

L'enregistrement des paramètres physiologiques, les rythmes respiratoire et cardiaque, ainsi que la température corporelle nous permettra d'assurer un bon niveau d'anesthésie afin d'éviter toute douleur. Le mélange anesthésique utilisé assure à la fois l'analgésie, la sédation et la myorelaxation.

621- Le projet vise à développer une nouvelle stratégie de vaccination pour les animaux domestiques contre des viroses pour lesquelles la vaccination conventionnelle n'est pas satisfaisante : vaccin universel contre la grippe (porc), et vaccin contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift (mouton), 2 virus responsables de zoonoses pour l'homme et l'animal. Ces stratégies vaccinales utilisent des molécules dirigées contre les cellules dendritiques de la peau du porc et du mouton, pour amener les antigènes vaccinaux (Grippe et Rift) aux cellules qui sont les plus efficaces pour initier la réponse vaccinale, évitant ainsi la dégradation et de mauvais ciblage des antigènes. Le ciblage vers les cellules dendritiques se fait par des portions d'anticorps monoclonaux faits chez la souris (AC anti-DC). Les tests de mise au point de vaccination chez le porc et le mouton requièrent la production de 20mg d'AC anti DC, pour 5 anticorps. Nous avons eu recours au système bioréacteur Integra Bioscience, et nous avons pu produire seulement 100µg d'anticorps anti DC mouton après 8 semaines, avec l'apparition d'une mortalité cellulaire de l'hybridome, rendant compte d'une non adaptabilité au bioréacteur (4 essais infructueux, > 750 euros). L'objectif de la demande est de produire des anticorps monoclonaux à partir de liquide d'ascite provoqués par les hybridomes chez la souris, méthode éprouvée qui permettra de produire 20 mg d'AC à partir de 10 souris. Toutes les précautions seront utilisées pour éviter la souffrance animale. Tous les hybridomes seront testés au préalable en bioréacteur et si leur production n'est pas satisfaisante, cela conduira à un total maximal de 50 souris. Nous n'avons pas d'alternative à cette production d'ascite pour mener à bien nos programmes à impact important pour la vaccination animale et humaine.

622- Les douleurs neuropathiques sont encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique dans la mesure où les traitements disponibles, qui ne reposent que sur des bases empiriques, sont à la fois peu efficaces et mal tolérés. De fait, elles sont rebelles aux antalgiques classiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens, morphiniques, etc), et on utilise des médicaments dont les visées thérapeutiques ne relèvent pas, en première intention, de la douleur : antidépresseurs, anticonvulsivants, anesthésiques locaux.

Notre objectif est de mettre en œuvre des modèles validés de douleurs neuropathiques chez le rongeur (rat et souris) afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, et d'analyser les effets de traitements antalgiques potentiels ou avérés sur ces mécanismes. Par cette double approche, mécanistique et pharmacologique, nous espérons pouvoir identifier de nouvelles cibles moléculaires pour le développement de composés plus spécifiques, et donc à la fois plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires que les antidépresseurs et autres anticonvulsivants.

Les douleurs neuropathiques se définissent par des symptômes caractéristiques : hyperalgésie, allodynie, dus à la sensibilisation des voies neuronales assurant la transmission des influx nociceptifs jusqu'aux structures cérébrales d'intégration de la sensation douloureuse (cortex cérébral). Cette sensibilisation intervient à la suite d'une lésion de nerf(s),

qui conduit à des remaniements à la fois anatomiques et fonctionnels entraînant une activation endogène des voies de transmission de la douleur, même en l'absence de toute stimulation nociceptive périphérique (externe ou interne). En clinique, ce type de douleurs peut survenir à la suite d'interventions chirurgicales (lorsque des nerfs sont sectionnés ou lésés), dans certaines pathologies chroniques (neuropathie diabétique, neuropathie herpétique, sclérose en plaques), ou au cours de traitements médicamenteux (en particulier avec des agents anti-cancéreux et anti-rétroviraux).

Les interventions ou traitements que l'on réalisera chez l'animal visent à reproduire les symptômes typiques de la douleur neuropathique chez l'homme. En l'occurrence, nous pratiquerons des ligatures (unilatérales) sur le nerf sciatique ou le nerf infraorbitaire chez le rat et la souris, et l'allodynie et l'hyperalgésie induites seront quantifiées à l'aide de tests comportementaux validés (test de pression sur la patte de Randall et Selitto ; test des filaments de von Frey). D'autres animaux seront traités avec des agents algogènes administrés par voie intrathécale afin de sensibiliser la transmission des messages nociceptifs directement au niveau du système nerveux central. Les traitements visant à réduire l'allodynie et l'hyperalgésie feront appel à des antidépresseurs, des antiépileptiques, des inhibiteurs de connexines, des ligands du récepteur TrkB du BDNF, administrés seuls ou en association, en aigu ou en chronique. L'analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires en cause reposera sur des approches pharmacologiques, immunohistochimiques, biochimiques et de biologie moléculaire appliquées à des prélèvements tissulaires post mortem.

L'ensemble du programme pourra être réalisé avec une expérimentation sur un total de 960 rats (souche Sprague-Dawley) et 160 souris (lignée C57BL/6J). Dans tous les cas, les animaux seront maintenus dans des conditions de stabulation permettant de réduire au maximum les contacts potentiellement allodyniques, et euthanasiés immédiatement à la fin des expériences ou dès l'apparition du moindre signe de douleur/souffrance inacceptable au cours de la réalisation d'un protocole (règles d'éthique de l'International Association for the Study of Pain, IASP, 2003).

623- L'objectif de ces essais sur animaux de rente (porcin, ovin, bovin, volaille, équin, lapin) est de démontrer que l'appétence d'un nouveau médicament vétérinaire générique n'est pas différente de celle du médicament de référence, et/ou que le nouveau médicament vétérinaire générique n'a pas d'impact sur la consommation d'eau et d'aliment chez l'animal cible dans les conditions d'administration et aux doses recommandées.

2 groupes (Un groupe élément d'essai et un groupe élément de référence) de 10 à 20 animaux, randomisés sur le sexe et le poids sont élevés en box individuel ou en cage dans les conditions standard d'élevage de l'espèce animale concernée. Après une période d'adaptation de 7 jours minimum la consommation alimentaire et la consommation d'eau sont mesurées quotidiennement. Les animaux reçoivent tous les jours une quantité d'eau et d'aliment supérieure à leurs besoins de façon à mesurer la consommation totale quotidienne réelle.

A partir de 2 jours ou plus après la fin de la période d'adaptation, les éléments d'essai et de référence (témoins positifs ou négatifs) sont administrés aux animaux selon le mode de distribution (eau ou aliment), la posologie et leur durée d'utilisation respectives en fonction des caractéristiques des systèmes d'essai. Les doses et mode d'administration correspondent aux doses enregistrées sur l'AMM du produit de référence ou celles qui sont visées pour l'enregistrement du nouveau médicament vétérinaire générique. Après distribution d'une quantité quotidienne supérieure aux besoins, les consommations d'eau et d'aliment sont mesurées quotidiennement.

Après un période dite de « washout » (de 2 à 14 jours) une deuxième série de traitement et de mesures est effectuée en inversant le groupe élément d'essai et le groupe élément de référence. Le nombre annuel d'animaux concernés (toutes espèces confondues) est d'environ 200 animaux.

624- Les antipsychotiques sont des médicaments connus pour induire des effets secondaires métaboliques défavorables comme l'apparition d'une obésité abdominale, d'anomalies de la glycémie, du profil lipidique, qui à leur tour favorisent la survenue d'un diabète et de complications cardiovasculaires.

Leur utilisation chez la femme enceinte est possible. Cependant ces molécules peuvent traverser la barrière placentaire et passer également dans le lait maternel. On peut donc s'interroger sur les effets de ces molécules chez le fœtus, le nouveau-né puis l'adulte qu'il va devenir.

En effet, de nombreuses données ont démontré l'influence de certains événements de la période fœtale sur la survenue de maladies chroniques à l'âge adulte, posant les bases du concept du « déterminisme » : des stimuli délétères in-utero entraînent une réponse adaptative permanente du fœtus avec des conséquences sur la susceptibilité ultérieure à certaines maladies.

Les neuroleptiques modifiant le statut métabolique des mères exposées, nous nous proposons donc d'étudier sur la souris les conséquences métaboliques et cardiovasculaires à long terme sur les descendances. Cette étude porte sur plusieurs générations de souris et le nombre d'animaux étudiés sera de 330 souris au total. Bien entendu la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) a été prise en compte ; afin de limiter le mieux possible le nombre d'animaux nécessaire. Cependant, l'objectif de notre projet scientifique étant d'étudier les répercussions métaboliques d'une exposition anténatale aux neuroleptiques sur les descendances, l'utilisation d'un modèle animal s'avère incontournable.

625- Les recherches sur la programmation nutritionnelle permettent d'expliquer les origines précoces de maladies et troubles de l'adulte. Ainsi, l'exposition à un régime délétère dans le jeune âge peut perturber les capacités cognitives de l'individu et favoriser l'émergence de l'obésité ou d'autres maladies nutritionnelles à l'âge adulte. Le modèle porcin

représente un modèle d'étude particulièrement intéressant car son comportement alimentaire, sa physiologie digestive et ses fonctions cérébrales sont très proches de ceux de l'Homme. De plus, des anomalies cérébrales détectées chez l'Homme obèse, au niveau de zones cérébrales impliquées dans les apprentissages et le plaisir, ont également été décrites chez le miniporc adulte obèse. L'objectif de ce projet est d'étudier la manière dont une exposition précoce au gras et au sucre, via le régime maternel, peut conditionner l'émergence de troubles comportementaux, en relation avec la cognition ou l'alimentation, et modifier le devenir de certaines structures cérébrales. En comparant deux groupes d'animaux, dont les mères (N=8 par traitement) seront nourries de manière équilibrée ou avec un régime enrichi en gras et en sucre durant la gestation et la lactation, nous pourrions mettre en évidence ces phénomènes de programmation précoce. Des tests comportementaux visant à explorer les capacités cognitives, les préférences et la motivation alimentaire, permettront de décrire l'apparition de troubles spécifiques de l'exposition précoce (N=24 par traitement). Des prélèvements réalisés de manière post mortem chez un échantillon de porcelets permettront de décrire des anomalies de structures au niveau cérébral (N=8 par traitement). Le reste des animaux sera suivi jusqu'à l'âge adulte de manière à explorer les effets de l'exposition précoce sur les comportements (N=16 par traitement), la tolérance au glucose, et les fonctions centrales (N=10 par traitement). La tolérance au glucose sera estimée par IVGTT, ce qui nécessite de réaliser des prélèvements sanguins sériés après injection de glucose intraveineux. L'activité cérébrale sera estimée grâce à la tomographie d'émission de positons (18F-fluorodesoxyglucose), méthode non invasive requérant l'anesthésie des sujets. Pour explorer la neurotransmission dopaminergique, nous utiliserons une méthode de référence chez l'Homme, l'imagerie Dat-Scan par scintigraphie cérébrale (123I-ioflupane). Cette technique nécessite de poser un cathéter veineux (qui servira également aux IVGTT) durant un acte chirurgical stérile réalisé sous anesthésie et analgésie (Fentanyl, 18 µg/kg/min soit 0,4 ml/min), une semaine avant les imageries. Après une pré-anesthésie à la kétamine (5 mg/kg), l'anesthésie sera induite sous masque à l'isoflurane (3-5% v/v) puis poursuivie sous intubation. Un niveau chirurgical d'anesthésie sera maintenu tout au long de l'acte réalisé sous monitoring. L'analgésie sera complétée au réveil par une dose de chlorhydrate de morphine sous cutanée (10 mg in toto) et un traitement antibiotique prophylactique sera appliqué. Une procédure d'anesthésie similaire sera utilisée durant les séances d'imagerie cérébrale, mais sans analgésie puisque l'imagerie est totalement indolore. Les données physiologiques et comportementales seront analysées par ANOVA à multiples facteurs pour étudier les effets du traitement, du sexe, de l'âge, de la portée et de leurs interactions. Les données issues des imageries cérébrales seront analysées par cartographie statistique paramétrique (SPM) qui représente la méthode de référence pour ce type d'analyse.

626- Ce projet a pour but d'étudier la toxicité de molécules destinées au traitement des infections par le Virus Respiratoire Syncytial humain. Il s'agit du virus responsable, entre autre, de la plupart des bronchiolites du nourrisson. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement ni moyen de prévention disponible à large échelle contre ce virus qui atteint chaque année plus de 30 millions d'enfants dans le monde. Deux molécules ont été sélectionnées pour leur activité et leur faible toxicité in vitro. Elles seront testées sur 6 macaques cynomolgus, qui constituent un modèle privilégié d'infection par ce virus. Dans ce projet, les animaux recevront les molécules d'intérêt à plusieurs reprises, et leurs effets sur l'état de santé des animaux seront étudiés. Si les molécules montrent une absence de toxicité chez le macaque, un autre projet consistera à tester leur efficacité sur de nouveaux macaques infectés expérimentalement par ce virus.

627- La pathologie anévrismale peut se présenter sous 3 états différents (fusiforme sacciforme et disséquant). Notre objectif est de mettre au point sur le porc un modèle d'anévrisme disséquant de type 2 pour permettre de valider le traitement de cet anévrisme par un stent dit modulateur de flux multicouche (MFM). Les anévrismes sont usuellement traités en chirurgie conventionnelle par le remplacement d'un tronçon d'aorte malade par une prothèse vasculaire. Malgré les progrès constants des connaissances médicales et des solutions curatives, le traitement présente encore des échecs patents. L'autre technique qui présente certains avantages par rapport au traitement conventionnel se réalise par une technique endovasculaire (à l'intérieur du système vasculaire), en implantant au niveau de l'anévrisme une endoprothèse. Cette technique développée depuis près de 20 ans prend le pas sur la technique chirurgicale ouverte. Mais avec le temps, des endofuites (recirculations sanguines entre l'implant et l'anévrisme) sont malheureusement assez fréquentes, annihilant alors l'utilité de ce type d'intervention. Le deuxième élément non moins important est le fait que la technique endovasculaire actuelle, couvrant des artères d'intérêt majeur nécessitent une fenestration très difficile à réaliser, qui complique grandement cette technique. Aussi il apparaît très intéressant de proposer une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des anévrismes disséquants avec le stent multicouche à modulateur de flux.

Pour montrer son efficacité, cette étude présente une difficulté quant au modèle à proposer, l'objectif étant pour être suffisamment pertinent d'être proche de la pathologie humaine. Aucune espèce animale ne présente de façon naturelle un anévrisme de ce type en dehors du dindon et du cheval. Ces modèles pour diverses raisons ne sont pas utilisables. Aussi avons-nous comme objectif de produire un modèle proche de la réalité clinique et suffisamment reproductible pour permettre de mener une étude randomisée. Les résultats de l'étude préclinique doivent permettre de démontrer l'efficacité de ce Dispositif Médical (DM) pour traiter cette anomalie, très grave chez des patients.

L'espèce porc de la lignée FBM est le modèle qui nous apparaît le plus opportun pour mener cette étude. En effet nous avons à plusieurs reprises été amenés à utiliser ce modèle pour créer des anévrismes fusiformes, sacciformes et disséquants mais de type 3, notre limite étant de n'avoir jamais créé un anévrisme disséquant de type 2. Pour ce projet, un

total de 20 porcs sera utilisé. Ce projet associe une équipe hospitalière et des spécialistes de radiologie interventionnelle sur les animaux.

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

Les traitements antithrombotiques sont largement utilisés, avec un bénéfice prouvé pour prévenir les événements thrombo-emboliques chez les patients atteints de fibrillation auriculaire (FA) ou pour éviter d'autres complications ischémiques chez les patients présentant un syndrome coronarien aigu (SCA).

Les anticoagulants traditionnels (héparine non fractionnée, héparine de faible poids moléculaire, ...) sont généralement utilisés pour ces indications. Les limites de leur utilisation sont la variabilité de leurs profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, leur incapacité à inhiber la thrombine liée à la fibrine, le risque de thrombopénie induite par l'héparine, les interactions médicamenteuses et les saignements.

Pour remédier aux limites d'utilisation des anticoagulants traditionnels, de nouveaux agents anticoagulants, très sélectifs pour les facteurs de coagulation bloquant la synthèse de la thrombine sont en cours de développement.

La sémuloparine est un nouvel anticoagulant sélectif appartenant à la classe des héparines d'ultrabas poids moléculaire (HUBPM).

L'étude proposée a un pour objectif d'étudier la pharmacocinétique de la sémuloparine chez le porc, en comparaison avec 3 préparations différentes d'héparines (Enoxaparine, Amphastar ou Fondaparinux).

Pour répondre à cet objectif, l'étude sera divisée en 2 phases, chacune comprenant 20 animaux (4 groupes de 5 animaux) pour un total de 40 animaux utilisés. A la fin de cette étude, tous les animaux seront maintenus en vie.

629- L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont regroupées sur la base de caractéristiques cliniques communes : une atteinte prédominante des muscles proximaux des membres. Elles sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. La prévalence de toutes les LGMD réunies est estimée à 5 à 6 personnes sur 1 million.

Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour les LGMD, ce qui plaide pour l'élucidation des mécanismes pathologiques impliqués dans ces maladies afin de proposer des approches thérapeutiques innovantes. Dans ce projet, nous chercherons donc à :

- Mieux comprendre ces mécanismes physiopathologiques au niveau moléculaire à partir de prélèvements issus de modèles animaux déficients dans les différentes protéines impliquées dans les LGMD.
- Nous chercherons ensuite à valider l'implication des voies identifiées en reproduisant les perturbations observées dans des souris sauvages et en cherchant à corriger ces perturbations chez les souris modèles par correction génique ou pharmacologique.

Les résultats obtenus devraient nous permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour les LGMD grâce à l'identification des perturbations présentes au niveau de la cellule et des moyens permettant de rétablir l'état normal.

Dans ce projet, 1670 animaux seront utilisés, ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études. Le degré de contrainte que subiront ces animaux sera modéré. L'état de santé des animaux sera surveillé, aucun animal en souffrance ne sera laissé sans soin et tout sera mis en œuvre afin que les principes de remplacement, réduction et raffinement soient respectés. Nous nous attacherons dans un souci d'application de ces principes, à faire en sorte d'optimiser l'utilisation des animaux entre procédures chaque fois où cela s'avère possible.

630- La demande d'autorisation concerne une technique d'isolement de cellules par perfusion du foie chez le rat. Les hépatocytes primaires correspondent en effet à un modèle expérimental parfaitement adapté pour l'étude du métabolisme des lipides d'un point de vue biochimique et nutritionnel, notamment pour l'analyse des protéines natives (et non recombinantes ou issues de lignées cellulaires). Ces cellules expriment en abondance les enzymes dites désaturases impliquées dans la biosynthèse des acides gras et dont la fonctionnalité est recherchée selon le contexte nutritionnel (lipidique et glucidique). Par ailleurs, la culture est optimisée puisque les hépatocytes sont utilisés dans les deux thèmes de recherche développés, à savoir les acides gras saturés et les acides gras polyinsaturés. L'expérimentation est réalisée sur 45 animaux par an maximum. Le métabolisme est ensuite étudié en déterminant l'expression protéique, l'activité enzymatique, le profil en acides gras... dans des contextes nutritionnels spécifiques en acides gras saturés ou polyinsaturés reproduits in vitro. Ces expérimentations ont pour but d'améliorer les connaissances sur le métabolisme des lipides de manière à mieux comprendre les besoins nutritionnels chez l'Homme. L'approche in vitro, couplée à celle réalisée in vivo (non présentée ici), entre en effet aujourd'hui en compte dans les évaluations de l'ANSES pour la définition des Apports Nutritionnels Conseillés (ANC) en association avec les études épidémiologiques.

631- La demande d'autorisation concerne des travaux pratiques de nutrition dispensés sur le site de l'animalerie à des étudiants de Licence 3 à Master I. L'expérience consiste à étudier l'effet de régimes alimentaires sur le métabolisme lipidique et glucidique à partir du modèle rat. Les régimes alimentaires sont réalisés au laboratoire sous forme de

bouchons, sur la base des besoins nutritionnels connus pour des rats en croissance ou entretien. La composition en vitamines, protéines ou lipides y est modifiée selon les ateliers. Les animaux sont soumis à ces régimes pendant une durée variant de 5 jours à 4 semaines. Les étudiants démarrent leur TP après sacrifice des animaux pour les prélèvements de tissus. Ainsi le nombre d'animaux dépend-il de l'effectif en étudiants inscrits à la spécialité, sur la base en général d'un animal par étudiant et par TP, soit une estimation haute de 160 rats/an. Les résultats sont ensuite analysés avec le soutien du laboratoire de statistiques, sur la base généralement de 3 à 6 animaux / régime.

632- Chez les mammifères, les milliards de bactéries hébergées dans les parties distales du tractus gastro-intestinal établissent avec leur hôte des relations mutualistes qui contrôlent l'homéostasie. Ces relations sont notamment dépendantes du développement, chez l'hôte, d'un système immunitaire intestinal extrêmement complexe. Comprendre comment le système immunitaire contrôle le pal1enariat hôte/bactéries représente un enjeu majeur avec de nombreuses implications en physiologie et pathologie et, actuellement, aucune autre approche que celle sur animal vivant ne permet d'envisager reproduire et analyser ce réseau d'interactions.

Grâce aux travaux comparant animaux conventionnels et animaux sans germe (ou axéniques), il a été montré depuis de nombreuses années que la maturation post-natale du système immunitaire intestinal est largement dépendante de la présence du microbiote. Néanmoins, la nature des réponses immunes établies à l'homéostasie et la notion que différents membres du microbiote pourraient jouer un rôle différent sur la mise en place des réponses immunes n'ont été décrites que récemment. Ainsi, grâce à l'utilisation de souris gnotobiotiques (nées axéniques puis colonisées avec des bactéries individuelles ou des microbiotes plus ou moins complexes), nous avons mis en évidence le rôle clé de la bactérie segmentée filamenteuse, ou SFB, dans la stimulation d'un large spectre de réponses immunes intestinales, innées mais aussi adaptatives, IgA et lymphocytaires T. Au contraire, la majorité des bactéries commensales semblent seulement capables d'induire une réponse IgA. Comment la SFB exerce ses propriétés immuno-stimulatrices exceptionnelles tout en maintenant l'homéostasie intestinale est encore une question non complètement élucidée, à laquelle nous désirons répondre. Cette question présente un intérêt supplémentaire majeur depuis l'identification récente d'une bactérie homologue de la SFB, chez l'homme.

Ainsi, notre expérience vise à comparer les réponses immunes de souris axéniques colonisées par SFB ou par des bactéries contrôles. Trois questions complémentaires sont envisagées. De fait, le nombre de souris axéniques nécessaires aux études proposées est estimé à 500. Il est évalué sur la base de deux essais indépendants par question posée, comprenant 5 animaux/lot (3 lots), différents temps de colonisation et 4 statuts bactériens différents.

633- Les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité dans les pays développés.

Elles sont caractérisées par une dégénérescence des tissus suite à une interruption de l'apport sanguin (ischémie). Les thérapies conventionnelles ne permettent pas de réparer le tissu lésé. C'est pourquoi, des essais cliniques de thérapie cellulaire de 1 ère génération ont montré une efficacité médiocre sur la réparation tissulaire, avec une amélioration fonctionnelle transitoire, probablement liée à un effet trophique des cellules injectées qui meurent peu de temps après injection, à cause du microenvironnement délétère du tissu lésé. Les objectifs actuels sont de développer des protocoles améliorant la prise de greffe des cellules. Par ailleurs, il a été montré que les progéniteurs endothéliaux circulants (PECs), des cellules rares circulant dans le sang, participent naturellement à la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse). Cependant, le développement de PECs comme produit de thérapie cellulaire est limité par leur faible fréquence dans le sang, la difficulté à multiplier ces cellules in vitro pour produire une quantité suffisante dans un milieu sans sérum et leur faible survie dans les tissus lésés.

Notre hypothèse est que l'association de produits matriciels devrait permettre d'optimiser ces facteurs limitants. En effet, dans les tissus lésés, l'inflammation induit un remodelage important, conduisant à une désorganisation des composants de la MEC. Si ces composants ne sont pas réarrangés, les produits de thérapie cellulaire injectés ont de très faibles chances de coloniser la zone détruite et de survivre dans ce microenvironnement anarchique. Les glycosaminoglycannes (GAGs) participent à la régulation des processus biologiques grâce à leur capacité à organiser spécifiquement la MEC. De plus, les GAGs potentialisent l'activité de certains facteurs de croissance et de survie cellulaires. Leur intérêt thérapeutique a déjà été démontré puisque l'utilisation de Fucoïdan, une molécule analogue, potentialise la revascularisation de membres inférieurs ischémiés dans des modèles animaux.

L'utilisation de GAGs naturels pour des applications thérapeutiques est cependant limitée par la difficulté de les extraire en quantités suffisantes, pures et parfaitement caractérisés, ainsi que par leur courte demi-vie in vivo, liée à leur dégradation enzymatique. C'est pourquoi depuis quelques années, la synthèse chimique de GAGs mimétiques est une nouvelle alternative.

Dans ce projet, mené en collaboration avec des partenaires académiques et industriels dans le cadre d'un financement ANR, nous cherchons à régénérer le système vasculaire dans les maladies ischémiques par 2 approches combinées : (1) la thérapie cellulaire en utilisant des Progéniteurs Endothéliaux Circulant (PEG) qui vont réparer les vaisseaux lésés (2) la thérapie matricielle en utilisant des sucres ou Glycosaminoglycannes (GAG) de la matrice extracellulaire qui vont réparer les tissus fortement dégradés dans ces maladies. Pour cela nous utilisons des GAG de synthèse, mimant les propriétés des GAG naturels, qui se lient aux facteurs de croissance et aux cytokines et augmentent leur efficacité. Notre objectif est de démontrer In vitro que des GAG mimétiques ou naturels sont capables de potentialiser différentes propriétés de ces

cellules, avec pour but de développer un milieu de culture qui permette une amplification optimale de ces cellules in vitro, en quantité suffisante pour être injectées comme médicament.

Ainsi nos résultats nous ont permis de sélectionner 2 GAG mimétiques qui, une fois associés à des milieux de cultures in vitro de PEC, permettent d'optimiser leur capacités à former se multiplier, à migrer, à se différencier en cellules endothéliales matures susceptibles de réparer les vaisseaux. Ces résultats sont particulièrement importants car ils démontrent qu'il nous est possible, à partir d'une population très rare dans le sang, d'obtenir des quantités importantes de cellules matures, dans des conditions d'amplifications optimisées grâce à ces GAG mimétiques. Ces résultats qui sont uniquement basés sur des expériences in vitro nous ont permis de rédiger un article qui a été soumis à la revue internationale à comité de lecture « Stem Cell Research », et qui a reçu un avis très favorable en peu de temps. Cependant les rapporteurs nous demandent une expérience complémentaire afin de démontrer que ces cellules sont effectivement optimisées fonctionnellement pour former des tubes mais in-vivo.

Pour cela nous devons utiliser un protocole classique de mesure de néo-angiogenèse par injection de Matrigel in vivo. C'est ce protocole qui fait l'objet de la présente demande afin de nous permettre de valider la soumission de notre article.

634- La dégénérescence du disque intervertébral (DIV) conduit à des douleurs lombaires particulièrement douloureuses et invalidantes. Les traitements à visée symptomatique disponibles actuellement devraient laisser la place dans les prochaines années à des approches de médecine régénératrice. En effet, l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie discale ainsi que sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) offrent de nouvelles perspectives de traitement comme l'ingénierie tissulaire qui est basée sur la réparation d'un tissu lésé par une association de cellules régénératrices et de biomatériaux. Ce type d'approche est actuellement en cours d'investigations par la transplantation de cellules régénératrices dérivées de cellules souches à l'aide d'un hydrogel injectable auto-durcissant. L'utilisation de cellules souches implique la définition des modalités de différenciation de celles-ci afin d'obtenir des cellules au phénotype proche des cellules natives du NP. Dans ce contexte, des études préliminaires doivent être réalisées et font l'objet de la présente demande.

Un ou plusieurs cocktails de différenciation des cellules souches en cellules au phénotype proche de cellules du NP sont en cours de validation. L'efficacité de cette différenciation nucléopulpegénique in vitro sera ensuite évaluée in vivo par injection des cellules souches ainsi différenciées à l'aide d'un hydrogel dans des poches sous cutanées chez la souris nude. Cette évaluation in vivo chez l'animal fait l'objet de cette demande. Environ 70 souris nude seront nécessaires à la mise en œuvre de ces expérimentations. La formation d'un tissu adéquat sera suivie chez la souris par des techniques histologiques et immunohistologiques nécessitant l'euthanasie des 40 animaux quelques semaines après implantation des cellules associées à l'hydrogel.

Les résultats de ces expérimentations permettront d'établir ensuite la preuve de concept de l'utilisation d'une approche de médecine régénératrice pour le traitement de la dégénérescence discale, tout d'abord par de futurs essais précliniques chez l'animal (qui feront l'objet d'une demande préalable) avant d'engager un essai clinique chez l'homme.

635- *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à gram-négatif pathogène pour l'homme, souvent responsable d'infections nosocomiales et opportunistes. Une des portes d'entrée utilisée par cette bactérie est la voie intestinale. C'est particulièrement le cas dans les cas de bactériémie à *Pseudomonas* chez les patients neutropéniques recevant une chimiothérapie.

Des données produites par nos collaborateurs nord-américains et non encore publiées suggèrent que le système de sécrétion de type 6 (T6SS) de la bactérie est important dans sa colonisation intestinale.

Chez les bactéries à Gram négatif, la sécrétion de protéines dépend de complexes multiprotéiques dédiés à la sécrétion d'effecteurs nécessaires à la pathogénicité bactérienne. Le système de sécrétion de type 6 (T6SS) a été décrit comme jouant un rôle dans les interactions entre les bactéries et d'une part les cellules eucaryotes et d'autre part les autres bactéries. Récemment, il a été montré que le T6SS de *P. aeruginosa* est nécessaire pour la destruction d'autres espèces bactériennes.

Dans des expériences préliminaires, nos collaborateurs nord-américains ont utilisé un modèle de colonisation intestinale chronique chez des souris à flore normale. Ils ont observé que les bactéries *P. aeruginosa* possédant le gène T6SS ne pouvaient pas coloniser l'intestin murin, alors que les *P. aeruginosa* invalidées pour le gène T6SS en étaient capables. Ces résultats suggèrent que le T6SS de *P. aeruginosa* est une cible de la réponse de l'hôte dirigée contre cette bactérie. Néanmoins, il n'est pas possible à ce stade de savoir si la réponse est médiée par le système immunitaire de l'hôte ou par la flore intestinale commensale.

L'objectif de notre projet est d'établir si la réponse ciblant le T6SS de *P. aeruginosa* est dépendante de la flore commensale. Pour cela, nous utiliserons des bactéries *P. aeruginosa* sauvages et invalidées pour le T6SS et des souris axéniques. Le rôle du T6SS sera étudié (i) dans la colonisation du tube digestif murin indépendamment du microbiote intestinal et (ii) dans la persistance de *P. aeruginosa* suivant la colonisation par un microbiote murin normal. Nous porterons une attention particulière aux effets du T6SS de *P. aeruginosa* sur la composition du microbiote intestinal. Pour la réalisation de ce projet, 70 à 105 souris (C3H femelles axéniques) seront utilisées.

636- Pour comparer la sécurité générale du 4-Phenylbutyrate couplé à la D-alanine (D-Ala-4PB) à celle du 4-PB, les groupes de rats Wistar recevront le composé D-Ala-4PB à trois niveaux de doses, et le 4-PB à la dose équimolaire la plus forte, administrés per os pendant quatre semaines avec une évaluation complète des effets indésirables potentiels.

Contexte

Les données cliniques ont démontré une excellente tolérance et l'efficacité de 4-PB contre plusieurs tumeurs. Des données récentes suggèrent que la nouvelle formulation D-alanine liée 4-PB, D-Ala-4PB, peut conférer une activité supérieure par rapport 4PB (données non publiées). Les deux composantes de D-Ala-4PB, 4PB et D-Ala, semblent bien tolérées à des doses élevées (Chem base de données). Sur la base de l'excellente tolérabilité des 4PB et D-Ala de la nouvelle formulation, la tolérabilité de D-Ala-4PB ne devrait pas différer de celle du 4PB. Nous proposons donc de vérifier l'absence d'effets adverses de D-Ala-4PB et de le comparer à 4PB à la concentration équimolaire la plus forte. Nous avons l'intention d'administrer 30, 100 et 300 mg de D-Ala-4PB, pour un rat de 200g, et de comparer à 200mg de 4PB et au véhicule seul.

Application 3R: Pour évaluer l'innocuité de la substance D-Ala-4PB avant des études chez le patient on a besoin d'une étude in vivo, qui permet une prédiction des effets adverses sur un organisme entier et donc nous proposons le rat, typiquement utilisé en toxicologie. En respect du principe 3R nous avons conduit des expériences sur des lignées cellulaires avec D-Ala-4PB, mais l'absence de toxicité in vitro ne permet pas d'extrapoler sur les conditions in vivo. Pour réduire le nombre des animaux nous proposons d'utiliser seulement 50 rats (5 groupes de 10 rats), en une étude unique, avec une analyse complète des données. Donc cette étude chez le rat est nécessaire pour éviter des effets secondaires chez l'homme, et l'administration per os chez le rat est non-invasive, légère et sans douleur.

637- 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 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 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 (NCL siRNA) ont été développés ces dernières années. 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. Ces travaux seront conduits sur près de 400 souris. 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.

638- Les nouveau-nés sont susceptibles d'être exposés à différents agents anesthésiques, notamment dans le contexte de la prématurité. En effet, la prématurité concerne 60 % des enfants nés par césarienne sous anesthésie générale. Les nouveau-nés, et en particulier les prématurés, peuvent aussi être fréquemment exposés à des interventions thérapeutiques (ventilation artificielle, alimentation par sonde gastrique, injections de médicaments et prélèvements sanguins) et chirurgicales qui nécessitent l'emploi d'anesthésiques, pouvant être associés à des analgésiques. D'autre part, l'évaluation, la prévention et le traitement de la douleur du nouveau-né sont des priorités des services de néonatalogie et des agents anesthésiques sont administrés en fonction de scores de douleur du nouveau-né. Mais le choix de l'agent anesthésique n'est pas consensuel en néonatalogie. Le clinicien s'attache à trouver le meilleur équilibre entre l'efficacité de l'agent anesthésique et ses effets secondaires. Les drogues habituellement utilisées pour la sédation et l'analgésie en néonatalogie sont les opioïdes, la kétamine (antagoniste non compétitif du récepteur NMDA), les benzodiazépines, les barbituriques et le propofol (potentialisateurs du récepteur GABAA). Le mode d'action des agents anesthésiques passe obligatoirement par une perturbation de la communication cellulaire cérébrale participant activement au développement cérébral normal, lequel est loin d'être achevé chez le nouveau-né. De plus, les nouveau-nés sont susceptibles de présenter des séquelles neurologiques d'origine périnatale dont l'incidence est estimée à 2 enfants pour 1000 naissances. Les facteurs de risque sont la prématurité, les accidents hypoxo-ischémiques, les infections foeto-placentaires et l'exposition à des toxiques. Des études doivent donc être menées sur des modèles animaux pour évaluer les conséquences des traitements anesthésiques sur le cerveau en développement. En effet, des études expérimentales réalisées chez l'animal ont amené des doutes quant à l'innocuité des traitements anesthésiques. L'étude des conséquences de l'administration d'anesthésiques chez le nouveau-né peut être modélisée chez la souris. En effet, la maturité développementale du cortex de souris âgées de 2 (P2), 5 (P5) ou 10 jours (P10) correspond respectivement chez l'humain aux stades de développement du cortex à 24, 30-32 ou 37-39 semaines d'aménorrhée (ceci a été estimé sur la base de l'observation des lésions cérébrales pouvant apparaître à ces différents âges).

Deux anesthésiques, kétamine (antagoniste NMDA) et rémifentanyl (morphinique μ utilisé sous sa forme commerciale Ultiva) seront administrés de façon aiguë ou chronique par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée chez le souriceau (P2, P5 ou P10) ou la souris gestante. L'impact des anesthésiques sur le cerveau immature est évalué par des approches neurochimiques, de biologie cellulaire et moléculaire à plusieurs stades de développement chez le souriceau. Enfin, l'incidence des anesthésies périnatales sera évaluée sur le comportement moteur des souris nouveau-nées et adultes par

des tests comportementaux. Le nombre total de souris envisagé pour le projet est de 1800 par âge (4 âges) pour les souris NMRI et de 900 par âge (4 âges) pour les souris GadGFP.

639- Le DU de Chirurgie Expérimentale, dispensé à l'Ecole de Chirurgie, est une formation permettant aux candidats (titulaire d'une formation en expérimentation animale niveau 1 ou II) d'acquérir les différentes techniques chirurgicales de base afin de répondre à une exigence réglementaire (selon le décret n02013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques) concernant la pratique de la chirurgie sur animaux.

Les enseignements pratiques sont tout d'abord dispensés:

- 1- sur pièces artificielles (peau, tubes de silicone),
- 2- sur pièces anatomiques (cœurs, pieds de cochons (animaux de boucherie)),
- 3- sur simulateurs

afin d'initier l'apprentissage des gestes de base.

Ensuite, seulement, les étudiants/stagiaires peuvent appliquer ces procédures sur l'animal. (1 cochon ou mouton pour 4 stagiaires et 1 rat ou lapin par stagiaire selon les exigences demandées).

Afin de dispenser un enseignement de qualité, les sessions seront limitées à 12 inscrits.

Cet enseignement comporte 48h au total soit:

17h de cours en e-learning,

5,5h de cours sur place et conférence/débat

25,5h de travaux pratiques.

640- Nous avons criblé 8 000 molécules injectables (dérivés Indoles) in vitro et identifié des molécules qui sont potentiellement des drogues pour éliminer les cellules leucémiques : elles entraînent l'apoptose des cellules leucémiques mais pas des cellules hématopoïétiques normales. Le but de l'expérimentation animale est de valider ces molécules dans un traitement in vivo. Après avoir injecté des cellules leucémiques (murines ou humaines) dans des souris receveuses, nous allons tester l'efficacité de ces nouvelles molécules identifiées et voir si elles sont capables d'inhiber la prolifération des cellules leucémiques. A des fins de recherche scientifique, 300 souris seront inclues dans nos protocoles expérimentaux, sur 4 années de recherche.

641- Ce projet s'inscrit dans un programme plus large visant à identifier et valider de nouveaux gènes responsables du syndrome de Kallmann (KS) et à en comprendre sa physiopathologie. Le KS est une maladie rare qui associe un hypogonadisme hypogonadotrope (HH) et un déficit de l'olfaction (anosmie) avec aplasie des bulbes olfactifs. Cette pathologie est une maladie développementale puisque l'HH est dû à un défaut, au cours de l'embryogenèse, de la migration des neurones qui synthétisent la GnRH (Gonadotrophin-Releasing Hormone) et dont dépend la reproduction. Normalement, ces neurones migrent de l'épithélium nasal vers le cerveau en utilisant le trajet des fibres des nerfs olfactifs qui sont en formation. Nous avons montré que le KS est dû à un défaut précoce de développement du système olfactif périphérique : une interruption de ces nerfs olfactifs empêche la migration des cellules produisant la GnRH jusqu'au cerveau. Le KS est génétiquement très hétérogène, tant par le nombre de gènes impliqués que par les différents modes de transmission de la maladie. Des mutations causales ont déjà été décrites dans 10 gènes. Toutefois, pour encore 65% des patients, aucune mutation dans aucun de ces 10 gènes n'a pu être identifiée. Nous recherchons donc actuellement dans notre cohorte de plus de 1000 patients des mutations dans un certain nombre de nouveaux gènes candidats, choisis selon différents critères. Nous disposons d'une plateforme de séquençage moyen et haut-débit dotée de séquenceurs dernière génération qui nous ont déjà permis de mettre en évidence des mutations dans certains de ces gènes candidats. Le projet présenté dans ce document consiste à valider l'implication de ces gènes dans le KS par l'étude de lignées de souris chez lesquelles ces gènes ont été invalidés en étudiant l'effet de leur absence sur le développement du système olfactif et la migration des neurones à GnRH au cours de l'embryogenèse. Ce projet prévoit l'utilisation de 180 souris (4 lignées génétiquement modifiées, nécessitant chacune l'étude de 45 souris, mâles et femelles). Les expériences seront réalisées en particulier sur des embryons de différents stades, de E11.5 à la naissance, ce qui implique des procédures différentes selon le stade étudié et la capacité des embryons à ressentir la douleur. L'analyse de stades embryonnaires implique également le sacrifice des femelles gestantes afin de pouvoir prélever les embryons.

En conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, il sera évité au maximum d'utiliser des souris dès que des résultats pourront être obtenus par d'autres moyens, grâce à des cultures cellulaires par exemple. De plus, les mêmes portées seront utilisées pour obtenir les animaux contrôles (sauvage, de génotype +/+) et les animaux KO (-/-) à partir de croisements entre adultes hétérozygotes. Chaque expérience sera répétée jusqu'à obtention de triplicats (au moins 3 embryons par condition) afin de s'assurer de la reproductibilité et de la validité des observations effectuées. Les conditions d'hébergement dans notre établissement utilisateur sont adéquates et les procédures expérimentales se feront sous anesthésie.

642- Une cellule doit adapter au mieux les outils dont elle dispose pour être la plus efficace possible: on parle alors de la mise en place d'un programme de différenciation cellulaire, lequel s'accompagne généralement de la génération

d'asymétries dans la morphologie de la cellule (polarité cellulaire). Ces deux aspects, différenciation et polarité cellulaires, sont très souvent liés et altérés dans les pathologies cancéreuses.

Les recherches développées par notre équipe visent à comprendre le rôle des protéines régulant la polarité cellulaire au cours du développement physiologique normal des vertébrés mais également dans le cadre du processus tumoral. Une protéine de liaison aux ARN récemment identifiée par l'équipe agit dans les voies de polarité et de différenciation cellulaires et est surexprimée dans les rhabdomyosarcomes (RMS) humains. Les RMS sont des tumeurs mésoenchymateuses malignes composées de cellules musculaires et affectant préférentiellement l'enfant et l'adolescent, elles représentent 10% des tumeurs solides pédiatriques. Notre projet présente deux parties distinctes concernant les rôles de cette protéine de liaison aux ARNm dans les tumeurs de type RMS d'une part et dans le muscle sain d'autre part, nécessitant l'utilisation de modèles murins.

1) La lignée de RMS humaine RH30 étant décrite pour induire des tumeurs chez des souris immunodéficientes, le but de notre première expérience est de vérifier si une lignée de RH30 dans laquelle notre protéine est absente présente des capacités réduites de prise et/ou de croissance tumorale *in vivo*. Dans ce cadre, les souris SCID immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Cette première partie du projet consistera donc à réaliser les expériences de greffes de cellules RH30 en utilisant 16 souris selo: 8 animaux par groupe pour obtenir des résultats statistiquement fiables dans le groupe contrôle (lignée exprimant un vecteur vide) et dans le groupe injecté avec la lignée dépourvue de notre protéine d'intérêt.

2) Afin de comprendre le rôle physiologique de notre protéine, nous avons généré une lignée de souris invalidées pour ce gène. Des données récentes suggérant que cette protéine pourrait réguler le statut des cellules souches du muscle, le but de cette seconde sera donc de comparer la capacité des cellules souches musculaires issues de souris contrôles ou invalidées pour notre gène à régénérer leur tissu musculaire après blessure. Ces expériences nécessiteront un total de 50 souris : 25 contrôles et 25 souris KO (5 animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables, dans 5 groupes correspondant aux jours 1, 3, 5, 10 et 15 après lésion musculaire).

Au cours de ces protocoles, Les expérimentateurs veillent à ce que le volume des tumeurs n'excède pas 10% du poids de la souris avant l'implantation (volume < 1cm³ pour une souris d'environ 25g). Les souris ne doivent donc pas souffrir de la présence de cette tumeur. Toutefois, toute souris présentant des signes de douleur importants (comportement agressif ; activité motrice diminuée, ...) serait immédiatement euthanasiée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse et sortirait par conséquent de l'étude.

643- Les norovirus (NoV) appartiennent à la famille des Caliciviridae. Ils sont aujourd'hui la première cause de gastro-entérite d'origine virale chez l'Homme. Il a été clairement démontré par notre équipe notamment que les NoV humains reconnaissent de manière différentielle des glycanes de la famille des antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGAs) et que la sensibilité des individus à l'infection par une souche donnée dépend du polymorphisme génétique aux loci ABO, Lewis des individus. Nous avons également démontré que les NoV d'origine bovine utilisent comme ligand cellulaire un antigène de la famille des HBGAs, l'épitope alpha gal, proche de l'antigène B présent chez les bovins. La perte d'expression de cet antigène chez l'homme laisse suggérer que ce virus bovin ne peut infecter l'homme.

La mise en évidence récente chez le chien de Norovirus pose la question du passage de barrière d'espèce de ces virus. Nous nous proposons de vérifier si ces virus reconnaissent comme les NoV humains et bovins ces glycanes afin d'apporter des données à l'évaluation du risque de transmission inter-espèce.

Pour conduire à bien ce projet, il est indispensable d'avoir du sérum hyper-immun permettant d'étudier par ELISA et par immunohistochimie la fixation des capsides de Norovirus canin sur les tissus de chien et de différentes espèces.

Ce projet concerne l'obtention de sérums de rats hyper-immuns vis-à-vis d'une capsid de Norovirus canin. L'immunisation de 2 rats Sprague-Dawley sera réalisée avec une protéine recombinante de la capsid. Les sérums collectés régulièrement seront analysés par ELISA pour suivre la cinétique d'immunisation. Si les titres en anticorps sont jugés insuffisants, une prolongation du protocole de 4 semaines sera demandée.

644- Le mouvement du noyau est requis lors de la migration cellulaire. Nous avons trouvé qu'une protéine de l'enveloppe nucléaire est impliquée dans le mouvement nucléaire et la migration cellulaire. De plus cette protéine est retrouvée mutée dans certains médulloblastomes, la forme la plus commune de tumeur cérébrale maligne et la majeure cause de létalité dans le cancer infantile. L'absence du gène codant pour cette protéine est létale pour la souris au stade embryonnaire. Le projet utilise des souris pour lesquelles ce gène peut être excisé grâce à des séquences Lox. Cette excision et donc la perte d'expression peut se faire préférentiellement, dans certains tissus ou à un certain moment du développement, par croisement avec des souris ayant une expression de la protéine d'excision Cre localisée dans ces tissus ou inducible. Le but est de retirer le gène seulement dans certains tissus ou à des stades spécifiques de développement afin d'étudier la fonction de ce gène dans des organes spécifiques comme le cerveau et le muscle. Un maximum de 500 souris (adultes/embryons) pourra être utilisé.

645- Chez de jeunes patientes atteintes de cancer, la mise en place de traitements anticancéreux peut entraîner une stérilité. La préservation de la fertilité avant la mise en place de ces traitements est aujourd'hui possible grâce à la

cryoconservation du tissu ovarien puis à la greffe de ce tissu une fois la patiente guérie et adulte. De même cette approche peut être également proposée pour préserver la génétique précieuse d'espèces menacées d'extinction et de races domestiques à petits effectifs. En effet le cortex ovarien contient une importante réserve de gamètes, présents sous forme de follicules primordiaux. Si ces stocks folliculaires semblent survivre aux différentes méthodes de cryopréservation, l'évaluation de la qualité du tissu au dégel reste délicate. En effet les follicules ne sont pas directement utilisables en procréation assistée car ils doivent subir un processus complexe de croissance et de différenciation du follicule au cours de la folliculogénèse.

Le présent projet propose de mener un travail expérimental sur des modèles animaux (ovins, cervidés et souris) afin de développer de nouvelles stratégies d'évaluation de la survie du tissu ovarien après cryoconservation. Ces stratégies s'appuieront sur la culture in vitro des fragments dégelés, leur greffe sur des souris immunotolérantes ou l'autogreffe. Elles permettront de définir des marqueurs moléculaires de la reprise de croissance folliculaire initiale, signe de la survie du fragment. La qualité des follicules produits au cours des expériences de folliculogénèse in vitro ou de greffes sera évaluée notamment en recourant à la production in vitro d'embryons.

La brebis constitue un excellent modèle de folliculogénèse pour d'éventuelles transpositions chez la femme. Les outils et connaissances développés seront donc utilisés afin de déterminer le protocole optimal de prélèvement et de cryoconservation (congélation, vitrification) et de le proposer comme outil de préservation de la fertilité chez la femme. Outre ses applications de santé publique, ce projet permettra d'importantes retombées en termes de maintien de la biodiversité. Cette technologie sera en effet utilisée chez les ongulés menacés d'extinction, chez les espèces domestiques en vue de conserver les races locales à petits effectifs menacées de disparition ou encore chez les espèces modèles (rat, souris) pour l'intérêt scientifique de conserver certaines lignées.

Le présent formulaire concerne les demandes d'expérimentation sur la brebis comme espèce dont les caractéristiques de la folliculogénèse sont proches de celles des cervidés et de la femme. Un total de 39 agnelles doivent être utilisées.

646- La formation des chirurgiens nécessite des apprentissages pratiques aussi bien que théoriques : après de nombreuses séances d'observation vidéos et des simulations de chirurgie sur des pièces anatomiques et des substituts, il est encore nécessaire de recourir à des séances de formation avec des animaux vertébrés pour se retrouver dans la situation d'un tissu vivant, mobile et vascularisé. Les chirurgies utilisant des dispositifs conçus pour l'homme, tels que les instruments de coelioscopie, peuvent être réalisées avec des porcs dont la taille des organes et l'anatomie générale est proche de l'homme. Ces séances sont réalisées en nombre limité après des enseignements sur simulateur, dans le cadre d'un programme de formation. Un maximum de 650 animaux est prévu sur 5 ans pour l'ensemble des formations initiales et continues des chirurgiens dans plusieurs domaines d'application médicale courante, telle que la chirurgie viscérale, urologique et traumatologie, ou encore pour l'apprentissage de nouveaux dispositifs.

Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation adaptée de sujets habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. Le nombre des animaux est réduit au minimum grâce à une gestion soignée des actes pratiques réalisés par chaque stagiaire.

647- La formation des chirurgiens nécessite des apprentissages pratiques aussi bien que théoriques: après de nombreuses séances d'observation vidéos et des simulations de chirurgie sur des pièces anatomiques et des substituts, il est encore nécessaire de recourir à des séances de formation avec des animaux vertébrés pour se retrouver dans la situation d'un tissu vivant, mobile et vascularisé. Les enseignements de microchirurgie peuvent être réalisés avec des rongeurs, car leurs vaisseaux et nerfs ont une taille et une structure comparables à des cibles d'intérêt médical de l'homme.

Ces séances, réalisées en nombre limité dans le cadre d'un programme de formation, ont pour objet de finaliser l'apprentissage technique de microdissection et sutures sous microscope opératoire. Un maximum de 2300 animaux est prévu sur 5 ans pour l'ensemble des formations initiales et continues des chirurgiens en microchirurgie vasculaire et nerveuse dans plusieurs domaines d'application médicale courante (pontage coronarien, anévrisme cérébral et greffe ..). Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation douce et calme d'animaux habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. Le nombre des animaux est réduit au minimum grâce à une gestion soignée des actes pratiques réalisés par chaque stagiaire.

648- Le projet se propose d'explorer dans un modèle murin orthotopique de carcinome rénal l'efficacité du candidat seul ou en combinaison avec des composés immunomodulateurs aux propriétés stimulatrices pour le système immunitaire (adjuvants). La première question abordée sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale du candidat seul dans ce modèle murin du cancer. Dans un second temps, l'impact des composés immunomodulateurs visant à activer le système immunitaire sera également évalué. Dans une troisième partie, les mécanismes supportant l'activité immunothérapeutique du candidat +/- adjuvant seront étudiés. Il sera investigué si l'activité thérapeutique observée dépend de la présence des lymphocytes CD4 et CD8. Les reins des animaux feront l'objet d'une analyse précise pour comprendre le rôle du candidat et des immunomodulateurs sur l'infiltration de l'organe par les différentes cellules du système immunitaire. Une analyse des facteurs solubles et des cellules sanguines périphériques sera également réalisée. Le nombre d'animaux par groupe

expérimental variera entre 5 et 10 en fonction du type de procédure afin d'optimiser le nombre d'animaux, avec au minimum une reproduction de chaque procédure. Le nombre maximum d'animaux envisagé pour ce projet est de 800. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité du candidat en association avec les composés immunomodulateurs (adjuvants).

649- L'équipe a récemment montré que TIF1gamma (TIF1g) agit comme un suppresseur de tumeur dans la leucémie myélo-monocytaire chronique (LM MC) chez l'Homme et la Souris. Notre modèle murin nullizygote pour TIF1g constitue un excellent modèle de la LMMC. Le but de cette expérience est d'identifier les populations hématopoïétiques responsables de la pathologie, ceci par transplantation de moelle osseuse.

Le but de cette expérience est d'étudier la transplantabilité des anomalies développées par des souris délétées du gène Dicer spécifiquement dans le tissu hématopoïétique.

650- Dans le cadre de l'élevage bovin, tous les progrès de la sélection animale ces dernières décennies sont basés sur la prise en considération de la génétique des animaux (génotype) par des techniques de plus en plus performantes (microsatellites, polymorphismes de séquence) et leur mise en œuvre de plus en plus en tôt (génotypage des embryons avant transfert). Il est donc possible aujourd'hui de sélectionner l'animal au meilleur génotype prédictif. Mais pour que le phénotype (caractère d'intérêt pour l'éleveur: production laitière, développement musculaire, reproduction) s'exprime à partir de ce génotype, il est nécessaire de réunir toutes les conditions environnementales adéquates. En effet celles-ci jouent sur l'expression des gènes via des marques dites épigénétiques qui contrôlent et orchestrent le fonctionnement du génome. Un nouveau champ d'investigation s'est donc ouvert récemment. Notre projet propose l'identification de signatures épigénétiques marqueurs ou prédictives de l'état de santé des vaches laitières de race Holstein. Ce projet vise une intégration de données de phénotypage (état de santé évalué par des données métaboliques des vaches et par la production laitière et le qualité du lait), de génotypage (données génétiques par indexation) et d'épigénotypage dans des conditions d'élevage classiquement mis en œuvre dans les unités expérimentales INRA (ce projet s'appuie sur 3 unités expérimentales différentes, la présente demande concerne 28 vaches). Une attention sera portée à l'alimentation des animaux. En effet, il est admis aujourd'hui que les problèmes de reproduction des vaches laitières hautes productrices puisent pour une grande part leurs origines dans le déséquilibre métabolique des animaux induits par la succession gestation-lactation-gestation. De ce fait, une complémentation alimentaire adaptée est proposée aux animaux en fonction de leur état physiologique (gestation - tarissement - lactation) afin d'améliorer leur bilan métabolique. Cette étude propose l'analyse de l'impact de deux complémentations différentes préconisées dans les élevages actuellement.

651- Le projet s'inscrit dans le programme de recherche qui vise ici à développer une nouvelle génération de composites injectables basés sur la chimie des ciments phosphocalciques et visant deux indications spécifiques liées à la chirurgie du rachis : le comblement de cages vertébrales inter somatiques et le renforcement de corps vertébraux fragilisés par l'ostéoporose. L'étude concernée s'inscrit plus précisément dans le développement du composite pour la première indication, le comblement de cages vertébrales inter somatiques.

En cas de dégénération discale intervertébrale ou de grandes déformation de la colonne (ex : scolioses ou cyphoses sévères), l'arthrodèse vertébrale est souvent recommandée. Pour se faire, l'insertion de cages intersomatiques (habituellement en métal ou en PEEK [polyether ether ketone], voir Figure 1, est une approche courante afin de stabiliser l'interface et de permettre la fusion osseuse entre les deux vertèbres considérées.

Pendant le taux de fusion observé dans ces cages vides est loin d'être optimal. Il peut être amélioré par un remplissage de la cage avec des morceaux d'autogreffes ou bien un insert taillé sur-mesure en céramique phosphocalcique résorbable. Ces derniers, de part leur nature fragile, sont réservés aux cages cervicales dans lesquelles ils donnent de bons résultats. Les applications, très nombreuses, au niveau du rachis lombaire sont hors de portée de ces inserts en raison de leur fragilité mais aussi à cause des formes complexes de ces cages pour lesquelles il est impossible d'usiner des formes en céramiques. Sur le marché, les chirurgiens du rachis ont de multitudes choix en termes de cage de fusion (forme, composition, instrumentation associée...). Les industriels du marché du rachis, ont développé et continuent à innover dans la conception de ces dispositifs médicaux. Leurs formes et leur tailles sont extrêmement diverses (voir Figure 1) et dépendent de la région anatomique traitée (cervical et thoraco-lombaire), la voie d'abord (antérieure, postérieure...) et le choix de développement de l'industriel dans le design de la cage.

De fait, la chambre disponible pour la greffe osseuse, indispensable pour réaliser la fusion osseuse des deux corps vertébraux, varie également en termes de taille et de forme.

L'un des avantages de la technologie de ce projet réside dans sa capacité d'être utilisable dans tous les types de cages existantes sur le marché. Sans contrainte logistique, à l'inverse de greffons osseux prêt taillé au préalable, le chirurgien pourra utiliser une dose de ce produit lors d'une fusion lombaire par voie antérieure et utiliser la même type de dose, lors d'une chirurgie nécessitant une fusion intersomatique en cervical.

C'est pourquoi l'utilisation de matériaux phosphocalciques injectables semble pertinente puis que leur formulation permettrait une adaptation parfaite quelque soit la forme de la cage. En modulant la plasticité d'un ciment phosphocalcique (CPC) classique, des avantages mécaniques supplémentaires seraient attendus qui limiteraient l'usure par abrasion et optimiseraient le contact os/matériau, point critique pour un succès clinique.

Le Projet présenté ici concerne l'évaluation d'un substitut osseux injectable seul ou associé à du sang autologue pour accélérer la fusion osseuse. La procédure expérimentale prévue concerne l'espèce ovine où 12 brebis seront opérées à deux niveaux lombaires (L1-L2 et L3-L4), chacune des deux cages recevra soit un biomatériau témoin soit le biomatériau additionné de sang.

652- Etudier l'efficacité d'une nouvelle thérapie ciblée dans les leucémies aiguës:

Une thérapie ciblée peut viser spécifiquement les cellules cancéreuses pour induire leur mort, contrairement à une chimiothérapie, qui s'attaque à toutes les cellules de l'organisme. Dans la leucémie aiguë lymphoïde à chromosome Philadelphie (LAL Ph+), les cellules leucémiques présentent un chromosome anormal appelé Philadelphie. Il entraîne la production d'une protéine tyrosine kinase, responsable de prolifération tumorale. Cette protéine peut être ciblée par des inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK). Cependant, les cellules malades acquièrent des mécanismes de résistances pour échapper aux traitements, responsables de rechutes fréquentes (50-60% des cas).

Pour limiter ces résistances, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à mettre en œuvre, en associant des thérapies ciblées qui agissent à différents niveaux sur la cellule leucémique par exemple.

Ainsi, notre objectif est d'étudier l'efficacité d'une combinaison de thérapies ciblées in vivo sur des souris leucémiques.

Une étude pilote mettra au point les greffes et les traitements chez 15 souris. Nous réaliserons une première expérience sur 4 groupes de 20 souris nude, qui sont des souris modérément immunodéprimées, ce qui leur permet d'accepter une greffe sans rejet. Ensuite, pour se rapprocher du modèle humain, nous étudierons 40 souris très immunodéprimées (NOD scid gamma (NSG)). Le nombre de souris a été réduit au minimum d'après des tests statistiques conférant à l'étude une puissance de 80%.

Le résultat attendu est l'amélioration de la survie des souris malades après exposition au nouveau traitement.

En pratique, les soins quotidiens des souris tiendront compte de leur statut immunodéprimé. Les animaux seront surveillés quotidiennement à l'aide d'une grille d'évaluation de la douleur. Ils seront pris en charge selon le score obtenu, avec mise à mort avant d'atteindre un point limite (par exemple perte de poids ou de mobilité). Il est nécessaire de signaler que la présence de cellules leucémiques ne cause pas de douleur. Par ailleurs, nous surveillerons les bilans sanguins de façon hebdomadaire.

Il s'agit donc de l'étude d'un nouveau traitement non testé dans la LAL Ph+. Nous avons montré son efficacité sur les cellules leucémiques in vitro. L'étude sur le modèle animal est l'étape suivante de notre travail. Elle est obligatoire avant d'envisager des études chez l'homme. Des résultats positifs feraient envisager rapidement un essai clinique dans cette pathologie dont le pronostic reste péjoratif.

653- Les maladies neuromusculaires entraînent chez la majorité des patients d'importantes déformations squelettiques, notamment de la colonne vertébrale, qui sont rapidement évolutives et qui viennent alourdir le handicap de ces patients. Ces déformations rachidiennes nécessitent une prise en charge précoce, par un traitement orthopédique sous la forme d'un port de divers corsets en permanence; mais les corsets ne représentent généralement qu'un traitement d'attente de la chirurgie. Ainsi, dans 90% des patients non marchant, la chirurgie devient nécessaire; le "Gold standard" actuel étant l'arthrodèse vertébrale.

Ce traitement a pour inconvénients majeurs de bloquer la croissance vertébrale, et de détruire la biomécanique du rachis (fusion précoce).

Le but de notre projet est de développer et de valider un nouveau dispositif médical implantable rachidien, basé sur une idée novatrice et originale récemment brevetée, autorisant la croissance du rachis.

La validation in vivo du dispositif sur modèle animal est cruciale dans le développement de ce projet, afin de valider la réponse de l'organisme en présence de ce nouveau montage, notamment la préservation de la croissance.

Notre équipe a déjà prouvé qu'il est possible de mettre en place expérimentalement une scoliose chez le porcelet en mettant en place chirurgicalement une contrainte mécanique sur les vertèbres en croissance.

Ce modèle va être mis à profit pour mettre en évidence l'efficacité d'un système chirurgical de traitement. Cet implant a pour but de corriger la courbure de la colonne vertébrale en suivant la croissance.

Une première série de 6 porcs va permettre de valider le bon fonctionnement du système, in vivo sur des animaux en croissance avec une colonne normale. S'il est validé que le système suit bien la croissance, il sera essayé sur un second groupe de 6 porcs chez qui, au préalable, une scoliose aura été provoquée par l'utilisation de notre modèle d'implant. L'expérience est modérément invalidante pour les animaux, qui sont maintenus en groupe sauf dans les phases post-chirurgicales. Une attention particulière est portée sur la gestion de la douleur au cours de toutes les phases du projet.

654- Le projet s'inscrit dans la formation initiale des étudiants en 3ème année de Pharmacie sous la forme de travaux pratiques. L'objectif du projet est d'apporter aux étudiants une formation pratique et théorique à l'utilisation des animaux dans le contexte de la recherche en psychopharmacologie. Une première partie théorique permet de décrire à l'aide d'un support vidéo l'éventail des tests comportementaux sur l'animal utilisés en psychopharmacologie ainsi que les contraintes éthiques et scientifiques spécifiques à ce type d'expérimentation. Une deuxième partie pratique permet de former les étudiants à la manipulation des animaux vigiles, à la caractérisation de substances psychoactives par l'observation du comportement animal et de leur faire appréhender l'utilité de l'expérimentation animale dans la découverte de nouveaux

médicaments psychotropes. Les animaux utilisés sont le rat et la souris. Les étudiants sont regroupés en binômes et chaque binôme dispose de trois rats et d'une souris. Ainsi le nombre total d'animaux varie selon les promotions mais se situe autour de 90 rats et 30 souris par an pour un effectif habituel de 60 étudiants. Il est important de rappeler que seuls les tests comportementaux permettent de caractériser les effets de médicaments psychotropes et qu'il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* ou *in silico* de remplacement.

De plus, étant donné les différences de sensibilité aux principes actifs observables d'un animal à l'autre, un nombre de trois animaux par groupe de deux étudiants est un strict minimum pour permettre à chaque étudiant d'apprendre à manipuler et ensuite pour pouvoir interpréter les résultats des expériences.

655- La thérapie génique est un concept novateur de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique (AN) thérapeutique dans les cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. De nombreuses affections mortelles ou invalidantes pourraient bénéficier de cette approche. Les vecteurs viraux et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) permettent de véhiculer et de protéger ces AN. Il a été montré qu'après une seule injection avec un AAVr le gène thérapeutique transféré peut être détecté dans les tissus transduits pendant plus de 10 ans.

Néanmoins, malgré quelques succès récents, la plupart des essais cliniques chez l'homme ont montré une efficacité de transfert du gène et d'expression à long terme trop faible pour permettre un effet thérapeutique. C'est notamment le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie génétique rare (1 garçon pour 3500 naissances) entraînant une perte de la locomotion précoce et une mort vers 30 ans.

Pour pallier à ce manque d'efficacité, la communauté scientifique s'oriente vers l'administration de doses de vecteur toujours plus fortes. Néanmoins plusieurs études suggèrent un lien entre la dose administrée et différents effets secondaires indésirables.

L'objectif de ce projet est d'augmenter l'efficacité thérapeutique des vecteurs AAVr sans augmenter la dose injectée dans un modèle murin de DMD. Pour cela, nous souhaitons combiner un traitement pharmacologique transitoire avant et après injection du vecteur thérapeutique dans le but d'obtenir un effet synergique des 2 thérapies. Plusieurs familles de molécules ont été sélectionnées en se basant sur la littérature scientifique ainsi que nos expériences préliminaires: (1) anti-inflammatoire stéroïdien (2) inhibiteur du protéasome (3) inhibiteur d'histone désacétylase (4) inhibiteur d'histone méthyltransférase (5) antioxydant et (6) couple donneur de NO / anti-inflammatoire non stéroïdien. Des molécules appartenant à chacun de ces 6 groupes sont en cours d'évaluation clinique chez l'homme voire même déjà disponibles sur le marché pour certaines. En cas de succès ce projet devrait permettre un transfert rapide vers la clinique.

Un modèle *in vitro* n'est pas en mesure de récapituler la complexité des interactions entre le gène thérapeutique et l'environnement auquel il sera confronté chez le patient humain. L'utilisation de la souris est justifiée à la fois par l'existence de plusieurs modèles de DMD ainsi que la possibilité de constituer des groupes d'animaux suffisamment larges pour pouvoir effectuer des calculs statistiques. En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'environ 500 animaux pour l'expérimentation ainsi que 225 animaux pour l'entretien de la lignée. Nous avons sélectionné des molécules qui ont déjà toutes été administrées à des souris avec une bonne tolérance générale, à des doses et pendant des durées supérieures ou égales à ce qui est envisagé dans ce projet. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. En cas de 3 signes cliniques notables observés ou 1 signe clinique sévère, l'euthanasie des animaux pourra être décidée avant la fin du protocole, après consultation des responsables de la mise en œuvre du projet ainsi que du vétérinaire référent.

656- De nombreuses études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont montré que des stress psychosociologiques chroniques ou aigus peuvent entraîner des troubles comportementaux, en particulier des symptômes d'anxiété et de dépression. Les changements neurochimiques et neuroanatomiques responsables des troubles anxio-dépressifs ne sont que partiellement compris. Les situations de stress négatifs ont été largement utilisées pour étudier les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire chez l'animal. En revanche, les mécanismes moléculaires et cellulaires qui participent au dialogue entre système nerveux et «périphérie» sont totalement méconnus dans un contexte de stress positif; c'est par exemple le cas d'animaux de laboratoire hébergés dans un environnement enrichi (EE) dans lequel ils bénéficient de stimulations sensorielles, motrices, sociales et cognitives.

Le but de notre programme de recherche pour les 4 ans à venir est de caractériser dans un premier temps, les modifications fonctionnelles et neuroanatomiques du système nerveux central induites par un stress positif (EE) et de comprendre comment ces modifications influent sur le fonctionnement du système immunitaire. Dans un second temps, nous tenterons de disséquer les mécanismes moléculaires du dialogue entre système immunitaire et cerveau. En particulier, nous nous intéresserons au rôle des acteurs de l'immunité (cytokines, cellules immunes, ...) dans le fonctionnement cérébral en situations de stress positifs (EE) et de troubles anxio-dépressifs. Les paradigmes d'apprentissage, d'interactions sociales, d'anxiété et de dépression sont bien documentés chez la souris (souche C57BL6/J) du point de vue comportemental et neurobiologique. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi cette souche murine; 684 souris seront nécessaires à l'accomplissement de notre programme de recherche.

657- La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares. Dans la population caucasienne, la maladie représente environ une naissance sur 4500. Il s'agit d'une maladie mortelle qui touche principalement les poumons, le pancréas,

l'intestin, les glandes sudoripares et qui s'exprime dès la petite enfance avec une prise en charge lourde et onéreuse La mucoviscidose est une maladie génétique due aux mutations du gène *cftr* (cystic fibrosis transmembrane protein). Le produit du gène *cftr*, la protéine CFTR, est une protéine multifonctionnelle dont l'un des rôles principaux est de former un canal permettant le passage des ions chlorures (Cl⁻) au travers de la membrane de la cellule.

La plupart des mutations du gène *cftr* conduisent à des anomalies du transport de Cl⁻ et à des défauts de transport des fluides. La mutation la plus fréquente est la délétion d'un acide aminé, la phénylalanine, en position 508 (mutation notée F508del dans le projet).

Les progrès importants dans la prise en charge des symptômes de la maladie et les possibilités de transplantations d'organes ont conduit à une augmentation importante de l'espérance de vie chez ces patients. Toutefois les formes graves entraînent toujours une mortalité précoce et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement de la maladie.

La protéine CFTR interagit avec de nombreuses protéines. In vitro la protéine mutée F508del interagit fortement avec la cytotkératine 8 (K8), ce qui favorise sa dégradation et l'empêche d'atteindre la membrane de la cellule. Toutefois, même si CFTR-F508del atteint la membrane apicale, elle présente un défaut de fonction.

Ce projet vise à étudier les interactions entre CFTR et la protéine K8 sur des modèles de souris qui ont été modifiées pour que s'expriment ou non les protéines d'intérêt c'est-à-dire CFTR, F508del CFTR et/ou K8. Pour cela, des tests qui permettent de mettre en évidence des anomalies de la fonction de CFTR seront utilisés. Aucune méthode in vitro ne permet d'accéder aux informations recherchées dans ce projet. L'enrichissement du milieu d'hébergement sera assuré par ajout dans la cage de papier permettant aux souris de réaliser un nid et de s'y enfouir. La taille des groupes a été déterminé de manière à ce que l'on puisse avoir des résultats exploitables et que le minimum d'animaux soit utilisé. Lorsque cela est possible, une souris pourra subir plusieurs procédures ce qui permet réduire le nombre d'animaux utilisées. Cela est possible car certaines de nos procédures sont non invasives et non douloureuses et ne nécessitent une anesthésie que pour garantir l'immobilité de l'animal et/ou pour permettre des injections. Le nombre maximum d'animaux prévus dans ce projet sera d'approximativement 175 souris.

658- Les cancers primitifs du foie (carcinome hépatocellulaire, cholangiocarcinome) représentent 7000 et 2000 nouveaux cas par an en France. Ce sont deux tumeurs de très mauvais pronostic. Les traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%).

Cependant, l'efficacité des traitements curatifs est grevée par la récurrence tumorale liée à la dissémination métastatique ou à l'émergence d'une nouvelle tumeur si le foie malade cirrhotique est laissé en place. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafenib, mais son efficacité est limitée et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Aucun traitement palliatif montrant un bénéfice sur la survie ne peut être proposé aux patients ayant un cholangiocarcinome non opérable.

Dans ce contexte, nos projets de recherche ont pour objectif de caractériser et quantifier l'activité de nouveaux médicaments pour le traitement des tumeurs hépatiques. La preuve d'activité/efficacité anti-tumorale des candidats médicaments sera faite au préalable in vitro sur des lignées humaines de carcinome hépatocellulaire ou de cholangiocarcinome. Des évaluations seront ensuite conduites in vivo dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer hépatique chez la souris immunodéprimée (demande d'autorisation demandée pour les xénogreffes sous-cutanées). Cependant, certains médicaments pourraient s'avérer aussi efficaces pour limiter la dissémination métastatique et le modèle de xénogreffe sous-cutanée ne permet d'étudier cet aspect.

Aussi, nous souhaitons pour nos études développer un modèle de xénogreffe orthotopique dans le foie chez la souris immunodéprimée. L'utilisation d'un modèle murin de xénogreffe orthotopique de cellules cancéreuses du foie se justifie à double titre: tout d'abord, il permet de recréer au plus près l'environnement dans lequel prolifèrent les cellules tumorales. Deuxièmement, il permet d'analyser la capacité des cellules tumorales à métastaser et permet donc d'étudier l'efficacité de médicaments sur la dissémination métastatique. Ce modèle est plus « lourd » d'un point de vue chirurgical que le modèle de greffe en sous-cutanée (projet 01350) et sera donc utilisé sur un nombre beaucoup plus restreint d'animaux (n=90). Dans ce modèle, nous étudierons les médicaments pour lesquels nous aurons montré au préalable in vitro un effet sur les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses. Le nombre d'animaux par groupe sera réduit à son strict minimum (n=10).

Afin que le bien-être animal soit au mieux respecté, des critères précis d'interruption du protocole par euthanasie seront définis.

659- La stéatose hépatique non alcoolique, définie par l'accumulation de lipides dans le foie en absence de consommation notable d'alcool, est une maladie qui touche 30% de la population générale dans les pays industrialisés. Des études épidémiologiques ont montré qu'il existait une corrélation entre un défaut en vitamine D et la sévérité de la stéatose hépatique non alcoolique.

Par ailleurs, la stéatose hépatique expérimentale est diminuée lors d'un traitement par la vitamine D. La vitamine D est une hormone stéroïdienne qui module le métabolisme calcique et lipidique par l'intermédiaire du récepteur nucléaire de la vitamine D ou VDR. Dans ce contexte, VDR pourrait avoir un rôle dans le développement ou la sévérité de la stéatose hépatique non alcoolique.

Le projet a donc pour objectif d'étudier l'implication éventuelle de VDR dans la stéatose hépatique. La stéatose hépatique faisant appel à l'interaction de différents tissus exprimant VDR, l'implication de VDR dans cette pathologie ne pouvait être abordée que par l'analyse d'animaux invalidés génétiquement pour VDR. Pour répondre à l'objectif de l'étude, nous utiliserons donc des souris invalidées pour VDR, seul modèle animal génétiquement altéré pour VDR existant à ce jour. Le projet nécessitera l'utilisation d'un maximum de 400 souris sur une période de 4 ans. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance. D'une part, par le raffinement des protocoles décrit dans la saisine. D'autre part, par le remplacement du modèle animal par des modèles cellulaires dès que cela est pertinent.

660- Les jeunes animaux sont particulièrement sensibles aux infections gastro-intestinales et respiratoires. *Cryptosporidium parvum* est un agent zoonotique qui affecte tous les mammifères jeunes ou immunodéprimés. Il est à ce jour la première cause des entérites diarrhéiques du veau ou chevreau nouveau-né. L'objectif principal de l'équipe est d'étudier le développement du système immunitaire mucosal du jeune animal en utilisant la réponse intestinale à *Cryptosporidium parvum* comme modèle d'infection néonatale. La multiplication des cryptosporidies n'étant pas réalisable *in vitro* et afin de disposer de parasites infectants pour les études *in vitro* et *in vivo*, il est nécessaire de les multiplier sur des animaux sensibles. Parmi ceux-ci les jeunes bovins permettent d'obtenir le nombre de parasite suffisant sans multiplier le nombre d'animaux utilisés. La souche de parasite ne peut être congelée et doit être conservée à 4°C. La conservation des cryptosporidies à 4°C ne permet pas leur utilisation au-delà de 2 mois c'est pour cette raison qu'un maximum de 6 veaux par an sera nécessaire pour satisfaire les besoins de l'équipe de recherche, soit 30 pour la durée de la présente demande d'autorisation de projet.

661- Les cancers primitifs du foie (carcinome hépatocellulaire, cholangiocarcinome) représentent 7000 et 2000 nouveaux cas par an en France. Ce sont deux tumeurs de très mauvais pronostic. Les traitements curatifs (ablation de la tumeur, transplantation du foie) ne peuvent être proposés qu'à un nombre restreint de patients (40%). Cependant, le taux de récurrence est élevé notamment après la résection de la tumeur car le foie malade cirrhotique est laissé en place ce qui favorise l'émergence d'une nouvelle tumeur. Il n'existe pas de traitement de prévention de la récurrence. Les patients ayant un CHC non opérable bénéficient depuis 2008 d'un traitement systémique palliatif, le sorafenib, mais son efficacité est limitée et l'émergence de résistances est rapidement objectivée. Aucun traitement palliatif montrant un bénéfice sur la survie ne peut être proposé aux patients ayant un cholangiocarcinome non opérable. Dans ce contexte, nos projets de recherche ont pour objectif de caractériser et quantifier l'activité de nouvelles combinaisons pour améliorer l'efficacité du sorafenib et de tester de nouveaux médicaments pour le traitement des tumeurs hépatiques. La preuve d'activité/efficacité anti-tumorale des combinaisons ou des candidats médicaments sera faite au préalable *in vitro* sur des lignées humaines de carcinome hépatocellulaire et de cholangiocarcinome. Des évaluations seront ensuite conduites *in vivo* dans le modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules de cancer hépatique chez la souris immunodéprimée. Ce modèle expérimental est largement utilisé en recherche préclinique pour valider l'efficacité anti-tumorale de nouveaux médicaments car toute variation du volume tumoral est facilement appréciable par mesure directe de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse. Ces projets devraient utiliser environ 300 souris sur 5 ans. Chaque groupe de traitement inclura 7-8 souris, ce qui est le minimum pour avoir des résultats statistiquement exploitables. Afin que le bien-être animal soit au mieux respecté, des critères précis d'interruption du protocole seront définis.

662- Les tumeurs dites "MicroSatellite Instable" (MSI) correspondent à un type de tumeur particulier qui résulte de mécanismes de transformation cancéreuse propres. Le caractère instable des tumeurs MSI est liée à une déficience d'un système de réparation de l'ADN, le système "Mismatch Repair" (MMR). La localisation la plus fréquente des cancers MSI est le tube digestif, notamment le colon et le rectum. Ces tumeurs peuvent s'inscrire dans le cadre d'un syndrome de prédisposition génétique au cancer colorectal (syndrome de Lynch), ou survenir de manière sporadique. Il a été montré récemment que les cancers colorectaux MSI étaient, plus fréquemment que les cancers non MSI, associés à un déficit d'expression d'une autre enzyme de réparation de l'ADN, appelée MGMT, dans la tumeur et dans la muqueuse colique saine adjacente. Cette découverte ne permet pas d'explorer un éventuel lien de causalité entre ces 2 anomalies tumorales, ce que seule une étude fonctionnelle (*in vivo*) permettrait d'évaluer. Notre projet d'expérimentation animale s'inscrit dans la continuité de ces travaux et cherche à montrer chez la souris qu'un déficit en cette enzyme pourrait favoriser l'émergence de tumeurs MSI, ce qui corroborerait l'hypothèse selon laquelle le déficit en MGMT serait un événement précurseur précoce du processus tumoral MSI. Nous souhaitons étudier l'émergence de tumeurs chez des souris transgéniques présentant un déficit en MGMT et dont le génotype MMR varie (*Msh2*^{+/-}, *Msh2* wt et *Msh2* ko). Ce projet requiert l'utilisation de 320 souris au total (140 souris déficientes pour la MGMT et 180 souris non déficientes comme contrôles). Ce projet a été élaboré en prenant en compte la règle des 3R : l'utilisation d'un modèle murin est la seule approche permettant d'étudier le lien de causalité entre la déficience MGMT et le développement tumoral MSI et ne peut donc pas être remplacé. Nous avons défini des cohortes comprenant le nombre d'animaux minimal permettant d'analyser

l'incidence des tumeurs MSI, un phénotype qui devrait être rare à l'instar de ce qui est observé chez l'homme, tout en permettant d'atteindre une signification statistique. Nous avons défini des points limite et des délais de sacrifice stricts pour limiter la souffrance animale et la durée de l'expérimentation.

663- L'attention portée à la microvascularisation du muscle s'est avivée depuis quelques années notamment car la compréhension de l'organisation du réseau vasculaire et des interactions cellulaires qui en découlent entre cellules vasculaires et cellules souches musculaires, semble capitale pour développer des thérapies cellulaires et/ou géniques plus performantes dans le domaine des maladies neuromusculaires.

Les cellules endothéliales musculaires sont recouvertes de péricytes dans une proportion encore mal connue dans le muscle, au cours du développement et à l'âge adulte. Les péricytes sont d'importantes sources de molécules qui leur confèrent une fonction stabilisatrice de la paroi des vaisseaux. Comme il a déjà été fait antérieurement pour les cellules endothéliales, le présent projet propose d'évaluer les relations spatiales et fonctionnelles des péricytes et des cellules souches myogéniques, afin de caractériser anatomiquement et biologiquement la niche vasculaire des cellules souches musculaires.

Un travail in vitro a dorénavant et déjà permis de mettre en évidence des signaux moléculaires produits par les péricytes et influençant le comportement des cellules souches musculaires. Afin de confirmer l'importance des péricytes et de leurs signaux moléculaires in vivo, le présent projet propose d'utiliser des lignées murines transgéniques permettant de suivre les péricytes ou les cellules souches myogéniques grâce à l'expression spécifique de molécules fluorescentes et d'analyser leur comportement au cours du processus de régénération musculaire après induction d'une lésion.

Il sera ainsi possible d'avoir une visibilité accrue sur les phénomènes d'angiomyogénèse et l'implication des différents types cellulaires au cours de la régénération.

Pour chaque expérience, le nombre d'animaux utilisé par point sera réduit au minimum permettant des analyses statistiques fiables (entre 3 et 4 animaux), ainsi environ 190 souris devraient être nécessaires à la réalisation du projet.

664- L'objectif de ce projet est de prouver l'efficacité du produit testé (destiné au traitement de maladies du sang chez l'homme). Cette étape est nécessaire afin de déterminer si le produit testé pourrait être développé comme médicament humain pour le traitement de maladies du sang, et à terme apporter une thérapeutique adaptée aux patients atteints par ces pathologies.

Le projet utilise 22 singes cynomolgus qui reçoivent des administrations régulières de produit pendant 24 semaines. Afin de reproduire des conditions proches de la pathologie humaine, les animaux sont anémiés par des prises de sang répétées, dont le volume et la fréquence sont adaptés selon leur taux d'hémoglobine et leur état clinique. A la fin de l'étude, des examens histopathologiques sont effectués sur les principaux organes, nécessitant l'euthanasie préalable des animaux. L'efficacité du produit doit être démontrée sur un organisme vivant, et le singe est l'espèce se rapprochant le plus de l'espèce humaine et la mieux adaptée compte-tenu du mode de fonctionnement du produit testé. Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant, et correspond à ce qui doit être mis en œuvre pour des études réglementaires de ce type. Les animaux sont hébergés selon les standards en vigueur et socialisés pour la durée du projet. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

665- La perte de fonction physique liée au vieillissement impacte fortement l'indépendance et la qualité de vie des personnes âgées et a une incidence sociale et économique importante. Cette altération de la fonction physique est la conséquence d'une perte de la masse musculaire, phénomène appelé sarcopénie. Mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette sarcopénie et développer des approches nutritionnelles capables de ralentir son évolution a donc une importance majeure. Le vieillissement s'accompagne d'une modification de la biodisponibilité des acides aminés en réponse à un repas. En effet, la séquestration splanchnique des acides aminés (en particulier des acides aminés ramifiés, BCAA) est accrue chez les sujets âgés. Ceci diminue fortement la biodisponibilité de ces BCAA alors même qu'ils sont de puissants médiateurs de la réponse anabolique musculaire. La sarcopénie provoque également une réduction des réserves de glutamine de l'organisme. Or cet acide aminé joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Il est possible que l'augmentation de l'extraction splanchnique des acides aminés soit le reflet d'une augmentation du catabolisme des BCAA au niveau de l'intestin, ces derniers étant transaminés sous l'action de la BCATm afin de produire de la glutamine. Des résultats récents obtenus chez des rats âgés montrant une diminution à la fois des capacités de production et de l'efflux de glutamine du muscle et une diminution de la captation de la glutamine par l'intestin vont dans ce sens.

Nous faisons l'hypothèse que la fonte musculaire du sujet âgé induit une carence en glutamine qui est compensée dans le territoire splanchnique par l'augmentation de sa capacité à transaminer les BCAA afin de produire la glutamine nécessaire à l'intestin. Cette augmentation de l'activité transaminase expliquerait la forte extraction splanchnique observée chez les sujets âgés. L'objectif de ce projet est donc de mesurer le catabolisme des BCAA (activité et expression génique des enzymes impliquées) dans le territoire splanchnique (intestin et foie) et le muscle chez des rats jeunes et âgés. Pour cela nous utiliserons un total de 20 rats jeunes (10 rat en phase post-absorptive (PA) et 10 rats en phase post-prandiale (PP)) et 20 rats âgés (10 PA et 10 PP).

Cette étude pourrait avoir un impact sur le développement d'apport nutritionnel adapté au sujet âgé. En effet si l'augmentation de l'activité transaminase est effectivement responsable de l'augmentation de la séquestration splanchnique des acides aminés pour produire de la glutamine, il serait alors envisageable de prévenir la sarcopénie par la mise en place d'une nutrition supplémentée en glutamine pour ce type de population. Ceci réduirait l'extraction splanchnique et augmenterait la biodisponibilité des BCAA nécessaires au renouvellement protéique musculaire.

666- Des souris sont régulièrement générées par des collaborateurs afin de comprendre les mécanismes de maladies et de tester des thérapies. Dans ce projet, nous explorons la fonction du muscle squelettique de ces souris, afin de compléter ces études. Ces études sont centrées sur la dystrophie myotonique qui présente de nombreux signes cliniques dont la myotonie, c'est à dire une relaxation musculaire ralentie. Elle a pour origine des défauts d'épissage de nombreux gènes impliqués dans le cycle d'excitation-contraction-relaxation musculaire, comme ceux encodant le canal chlore, le DHPR, RyR... Il n'est pas possible de réaliser ce type d'étude au niveau cellulaire in vitro, ce qui oblige de réaliser notre étude chez l'animal entier. Le nombre de souris (900) est calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi.

667- Les androgènes et les glucocorticoïdes (hormones stéroïdiennes) sont depuis longtemps utilisés à des fins de dopage sportif ou testés pour lutter contre les effets néfastes du vieillissement musculaire et des maladies neuromusculaires (atrophie et faiblesse musculaires), notamment du fait qu'il est très largement répandu qu'ils sont capables de moduler chez l'adulte sain la masse et la force maximale musculaires. Ils sont peu onéreux et peuvent être obtenus facilement, contrairement aux procédés qui visent à inhiber la myostatine, un facteur qui inhibe la croissance musculaire. L'objectif général est de mieux étudier les effets à long terme des androgènes, des glucocorticoïdes et de l'inhibition de la myostatine lors du développement post-natal (pubertaire), lors de la récupération après une période d'inactivité, et lors de la récupération après une lésion musculaire. Nous étudierons 1260 souris au total

668- L'activité physique est déconseillée dans le cas des maladies neuromusculaires car on pense qu'elle est néfaste. En effet des contractions intenses peuvent rapidement provoquer des lésions du muscle squelettique dystrophique, qui peuvent se traduire par une diminution de la force maximale, une perte de l'intégrité de la fibre musculaire. Toutefois, des études récentes, dont les nôtres, montrent, que l'activité physique chronique n'exerce pas d'effet néfaste dans le cas d'un modèle murin de maladie neuromusculaire, la maladie de Duchenne de Boulogne (DMD). L'objectif général est de poursuivre l'analyse des effets de l'activité sur les muscles squelettiques de la souris mdx, et ceux d'autres modèles murins de pathologies neuromusculaire, comme la dystrophie myotonique (DM), la desminopathie. Nous étudions également le cœur. Nous étudierons 1500 souris au total, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur ces cellules. Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi et toutes les mesures sont prises afin d'éviter leur souffrance.

669- Le présent projet a pour cadre le développement d'un nouveau médicament. Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales d'étude de tolérance de véhicules en dose unique ou répétée. Un véhicule, ou excipient, est un agent utilisé pour permettre l'administration d'un principe actif (produit à tester) pendant les études de toxicologie, pharmacocinétique, pharmacologie, etc. Le véhicule est élaboré en fonction des propriétés du principe actif, de la durée et des objectifs de l'étude, etc. Il n'est donc pas toujours possible d'utiliser des véhicules «standards» dont la tolérance est connue. De plus, la tolérance d'un véhicule peut être espèce-spécifique. Il peut donc être nécessaire d'évaluer la tolérance du véhicule avant de mener les études de pharmacocinétique, métabolisme, pharmacologie, toxicocinétique et toxicologie afin d'éviter la répétition inutile de telles études.

Au cours des procédures expérimentales visant à étudier la tolérance des véhicules, des matrices biologiques «témoins» peuvent être prélevées pour être utilisées dans le développement et/ou la validation des méthodes de bioanalyse, en particulier afin d'évaluer l'impact du véhicule administré sur les performances de la méthode bioanalytique (effet matrice). L'étude de ce type d'effet matrice est requise par la réglementation.

Ce projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement lorsqu'un véhicule sélectionné pour une étude ou une série d'études n'a pas été précédemment utilisé dans ces voies, fréquence ou durée d'administration, quantités, espèce, etc. Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standards), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux objectifs. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une ou plusieurs procédures expérimentales. Il précise les éléments spécifiques comme le calendrier, les conditions de traitement (voie, fréquence) et d'examen, les gestes techniques. Les effectifs prévus sont les effectifs minimum qui permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente. L'effectif maximum total estimé est de 264 souris, 264 rats, 128 chiens et 128 lapins sur 5 ans.

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

Enfin, un petit nombre d'animaux supplémentaires est prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion; ceux qui ne sont pas utilisés, peuvent être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel après l'accord d'un vétérinaire qui statue sur l'état de santé et de bien-être des animaux ou utilisés pour préparer des matrices biologiques.

670- La tuberculose représente encore aujourd'hui une menace importante pour la santé dans de nombreux pays du monde, et ce, malgré l'existence d'un traitement antibiotique et d'un vaccin. En 2011, 8,7 millions de personnes ont développé une tuberculose et 1,4 million en sont mortes. Seules 10% des personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), l'agent infectieux responsable de la tuberculose, sont incapables de contenir l'infection et développent une tuberculose active. Dans la majorité des cas, les bacilles seront confinés à l'état dormant au sein d'une structure multicellulaire appelé granulome. Si cet état de latence peut perdurer des dizaines d'années, une réactivation est possible à tout moment, notamment en cas d'immunodépression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques et l'efficacité controversée du vaccin BCG à l'âge adulte justifient la recherche de nouveaux traitements.

L'approche de notre laboratoire consiste à développer un produit thérapeutique qui cible les différentes phases de la tuberculose. Pour cela, plusieurs antigènes de Mtb ont été sélectionnés qui couvrent les différentes phases de la maladie: active, latente et de ressuscitation. Ils sont exprimés par un vecteur viral non propagatif, le MVA (Modified Vaccinia Ankara), sous forme de différentes protéines de fusion.

L'immunogénicité de nos produits a été démontrée chez la souris, en injectant nos candidats et en mesurant l'interféron γ (IFN γ) produit par les splénocytes en réponse aux antigènes.

Ainsi, ce nouveau projet a pour but de documenter la réponse immunitaire induite chez la souris par nos produits en termes de cytotoxicité cellulaire, d'anticorps opsonisants et, de fonctionnalité des populations cellulaires recrutées. Ceci nous permettra de sélectionner de manière optimale le ou les produit(s) thérapeutique(s) candidat(s) qui seront amenés en développement clinique chez l'Homme.

Bien que le modèle murin ne reflète pas complètement la réponse cellulaire et granulomateuse observée chez l'Homme, il reste une bonne alternative. En effet, il permet d'évaluer la capacité des produits d'immunothérapie à induire une réponse immunitaire efficace contre le bacille de la tuberculose. De plus, le coût et le nombre d'animaux peuvent être réduits au minimum sans pour autant affecter la qualité des observations et de l'analyse statistique.

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

Ce projet inclura un maximum de 1635 animaux.

671- Il est aujourd'hui admis que l'infection respiratoire par les virus grippaux prédispose à des surinfections bactériennes. Les principaux agents bactériens incriminés sont des bactéries dites respiratoires dont *Staphylococcus aureus* (ou staphylocoque doré). Les données cliniques indiquent que la morbidité et mortalité par surinfection bactérienne post-grippe demeurent élevées malgré l'utilisation d'antibiotiques, suggérant un effet synergique des infections grippale et bactérienne. Ces complications ne surviennent pas uniquement sur les terrains considérés comme à risque, ce qui met en évidence le besoin urgent d'améliorer les stratégies de prévention et de développer de nouveaux traitements antigrippaux qui sont également capables de lutter contre une surinfection bactérienne.

Il a été montré que des protéines membranaires des cellules du système respiratoire, appartenant à la famille des PARs¹ (Protease-Activated Receptors), participent à la réponse immunitaire de l'organisme face à une infection avec le virus Influenza. Il est également suggéré une activité antibactérienne des PARs. Pourtant, aucune étude publiée à ce jour n'a étudié le rôle de ces molécules en co-infection.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les récepteurs PARs, en particulier PAR1 et PAR2, sont de bons candidats dans la recherche d'une nouvelle stratégie de traitement simultané aux infections à Influenza et *S. aureus*. L'objectif du présent projet est d'étudier l'activité antimicrobienne de molécules agonistes et antagonistes des PARs vis-à-vis de la co-infection virus grippal/*S. aureus*. Cette validation pourrait ouvrir la porte à une utilisation thérapeutique de ces molécules. Pour cela, le protocole prévoit l'utilisation de 84 souris C57B1/6. Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants.

L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation du présent projet et la souris reste un modèle adapté aux types de recherches envisagées. la souris reste le modèle le plus utilisé et le plus représentatif des infections grippales. En outre, ce projet fait partie de l'ANR FluCure, mettant en œuvre l'expérimentation animale sur modèle murin. les points limites à l'expérience seront les suivants: tout animal montrant une prostration ou une perte de poids supérieure à 20% de son poids sera immédiatement euthanasié.

¹ A l'heure actuelle, quatre PARs ont été identifiés (PAR1, PAR2, PAR3, PAR4).

672- *Staphylococcus aureus* (communément appelé staphylocoque doré) est une bactérie commensale de l'homme et de nombreux mammifères à sang chaud. Cependant, cette bactérie de plus en plus multirésistante aux antibiotiques possède de nombreux facteurs de virulence et est associée à de nombreuses infections allant du simple furoncle à des infections beaucoup plus sévères telles que la pneumonie nécrosante. Cette pneumonie atteint l'enfant et le jeune adulte

immunocompétent avec un taux de mortalité qui reste aujourd'hui élevé (56% à 4 jours). Il est donc aujourd'hui important de comprendre la physiopathologie de la maladie. Pour cela, le modèle murin de pneumonie est un outil essentiel dans la compréhension des mécanismes permettant la mise en place de cette pathologie.

Les souches de *S. aureus* entraînant cette pneumonie nécrosante sont toutes productrices d'une exotoxine, la leucocidine de Panton Valentine (PVL). La forme active de la PVL requiert l'assemblage de 2 polypeptides, LukS-PV et LukF-PV, en hétéro-oligomère formant un pore à la surface des cellules cibles qui sont principalement les polynucléaires neutrophiles. In vitro, il a été démontré que la PVL a une activité cytolytique et inflammatoire.

Le but de ce protocole est de mettre en place un modèle murin de pneumonie primaire avec un couple de souches de *S. aureus* exprimant ou non la PVL et d'étudier la physiopathologie de la maladie.

Pour cela, le protocole prévoit l'utilisation de 72 souris Balb/c.

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

673- Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique avec environ 400 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde et risquant de développer une cirrhose voire un cancer du foie. Aujourd'hui environ 1 million de décès/an dans le monde sont dus aux conséquences hépatiques de l'infection chronique par le VHB. Le traitement actuel le plus utilisé est un traitement « à vie », basé sur des analogues de nucléosides permettant de contrôler la réplication virale et l'évolution de la maladie mais ne permettant pas l'élimination du virus, qui persiste dans les cellules infectées. On estime aujourd'hui un taux de guérison de 3 à 5% chez les patients traités ; il existe donc un réel besoin médical de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant d'augmenter ce taux. Par ailleurs il a été montré dans de nombreuses études que l'élimination du virus implique que le patient développe une forte réponse immunitaire.

De ce fait, les approches de type immunothérapie qui permettraient d'induire une réponse immunitaire appropriée sont très favorisées.

Notre laboratoire développe actuellement un produit d'immunothérapie de ce type, basé sur un vecteur viral non répliquatif codant pour des antigènes du VHB, et qui a été sélectionné pour un développement clinique chez l'homme. Dans le contexte du développement de ce produit, nous évaluons aujourd'hui la possibilité de potentialiser l'effet du produit par une approche de thérapie combinée, impliquant le produit d'immunothérapie et d'autres molécules.

Le seul modèle animal infectable par le VHB est le chimpanzé mais son utilisation pour tester des candidats d'immunothérapie est exclue pour des raisons éthiques et économiques. Dans ce contexte, le modèle murin est une bonne alternative car bien que non-infectable par le VHB il permet d'évaluer, dans un contexte naïf ou spécifique du VHB lorsque les souris sont transgéniques pour le VHB, la capacité des produits d'immunothérapie à induire des réponses immunitaires telles que celles attendues chez l'homme et qui pourraient conduire à la guérison des patients. De plus, le coût et le nombre d'animaux peuvent être réduits à leur minimum sans pour autant affecter la qualité des observations et tout en permettant des analyses statistiques fiables.

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

Ce projet inclura au total 2728 animaux au maximum

674- 1-Objectif scientifique du projet:

Depuis 2006, il est désormais possible d'obtenir des cellules souches induites à partir de cellules différenciées adultes. Ces cellules, appelées iPS (pour induced pluripotent stem), présentent un intérêt majeur pour la médecine régénérative. Cependant, le procédé d'obtention de ces cellules souches reste relativement complexe. Nous avons établi au laboratoire un nouveau protocole de dérivation de cellules reprogrammées iPS en identifiant des molécules améliorant l'efficacité du processus de reprogrammation. Des travaux préliminaires in vitro ont démontré que ces cellules présentaient un fort potentiel de différenciation.

L'objectif de ce protocole est de tester la pluripotence de cellules reprogrammées obtenues au laboratoire, c'est à dire leur faculté à différencier dans les 3 feuillettes embryonnaires: ecto, méso et endoderme. Pour cela, nous utiliserons des souris immunodéficientes dans lesquelles nous injecterons nos cellules reprogrammées. Les souris développeront des tératomes, tumeurs que nous analyserons après sacrifice des animaux pour valider la présence de dérivés ecto, méso et endodermiques.

2- Retombées attendues

Le passage de cellules somatiques vers un état pluripotent est un champ d'investigation considérable en ce moment du fait des perspectives sans limite en thérapie cellulaire (c'est en ce sens que le prix Nobel de cette année a été décerné).

Cependant, à ce jour, la plupart des stratégies visant à améliorer la reprogrammation cellulaire passe par le transfert de gènes. L'identification de molécules de signalisation permettant de développer de nouveaux protocoles de reprogrammation représente un réel enjeu clinique pour les années à venir.

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

Seul un modèle murin permet de tester in vivo le potentiel de différenciation de cellules souches. L'approche d'analyse de tératome est la seule approche in vivo permettant de valider l'état pluripotent de cellules murines.

Le nombre de souris a été réduit au minimum nécessaire pour répondre à la question posée sans ambiguïté.

Les techniques utilisées minimiseront la souffrance animale (utilisations d'anesthésique et d'analgésique).

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

20 souris immunodéficientes NOD SCID seront utilisées pour réaliser l'approche.

675-1-Objectif scientifique du projet:

Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines », reflétant ainsi les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Au contraire des lymphomes B pour lesquels les contreparties normales sont le plus souvent connues et justifient la classification actuelle ainsi que l'utilisation des différentes thérapies, les cellules à l'origine des PTCL sont inconnues, à l'exception du lymphome T angio-immunoblastique dont la cellule originelle est le lymphocyte T helper folliculaire (TFH). La complexité du compartiment lymphocytaire T qui comprend à la fois des cellules à la frontière de l'immunité innée telles que les NKT (Natural Killer T cells) et les lymphocytes T $\gamma\delta$ ainsi que des sous-populations du système immunitaire adaptatif telles que les lymphocytes T $\alpha\beta$ naïfs, effecteurs, mémoires et régulateurs explique certainement les difficultés à définir plus précisément l'origine des PTCL. Ce projet consiste donc à mieux définir l'origine cellulaire de certains lymphomes T périphériques. Pour cela, nous allons mettre au point des modèles murins permettant le développement des cellules lymphomateuses T issues de patients et qui nous seront fournies par des cliniciens appartenant à l'institut dont nous faisons parti.

L'un des buts de cet institut est de collectionner des cellules de différents lymphomes T et B sous-forme de cellules congelées. Ces cellules seront transférées à des souris immunodéficientes afin de développer un lymphome et nous chercherons par différents outils l'origine de ces cellules dans le compartiment T.

2- Retombées attendues

Ces travaux devraient permettre d'améliorer la classification des lymphomes T et de définir de nouvelles molécules thérapeutiques beaucoup plus ciblées.

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

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe modérée.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Nombre total d'animaux : 296

676- Le but de ce projet préclinique est de développer une nouvelle stratégie de thérapie génique pour les maladies inflammatoires, en particulier la polyarthrite rhumatoïde. Elle est basée sur l'utilisation d'un nouveau vecteur lentiviral pour permettre aux cellules immunitaires recrutées sur le site d'inflammation de sécréter localement des cytokines anti-inflammatoires. La première partie de ce projet consistera à mettre au point et à caractériser précisément un modèle de souris humanisées pour la polyarthrite rhumatoïde. Des souris immunodéficientes seront greffées avec des cellules souches hématopoïétiques humaines afin de reconstituer un système immunitaire humain. Puis, l'arthrite sera induite par injection d'adjuvant de Freund dans les articulations.

Deux stratégies de thérapie génique seront ensuite explorées. La première consistera à mimer la transduction ex vivo de cellules immunitaires puis leur infusion chez le patient.

Une deuxième stratégie consistera à transduire in vivo les cellules immunitaires recrutées sur le site de l'inflammation (lymphocytes T et B, cellules dendritiques, macrophages) par injection du vecteur lentiviral.

Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences et mises au point in vitro afin de caractériser le gène thérapeutique et sa régulation. De plus, des expériences pilotes seront réalisées sur un nombre restreint d'animaux pour déterminer les meilleures conditions de transduction ex vivo et in vivo.

Ce projet est donc divisé en 6 procédures : une procédure d'élevage des souris immunodéficientes et 5 procédures expérimentales :

- Développement et caractérisation du modèle d'arthrite
- Expérience pilote pour mettre au point la greffe syngénique de lymphocytes B
- Thérapie génique ex vivo et greffe syngénique pour traiter l'inflammation
- Expérience pilote pour identifier le ou les meilleurs candidats pseudotypes pour la transduction in vivo.
- Thérapie génique par injection in vivo pour traiter l'inflammation

Ce projet prévoit l'utilisation de 660 animaux au total.

677- Ce projet est mené en collaboration avec 3 autres unités dans le cadre d'un consortium visant à évaluer les modèles murins humanisés pour les études contre les virus hépatiques.

Afin de mimer le système immunitaire humain tout en évitant d'expérimenter sur des primates, le modèle animal choisi est la souris humanisée avec des cellules hématopoïétiques humaines. Plusieurs modèles murins humanisés permettent d'ors et déjà des études de transfert de gène ou d'immunologie. Dans le contexte du consortium, nous devons évaluer et comparer notre modèle NSG par rapport aux modèles 1) Rag2 gammac Sirpa), 2) Rag2 gammac SirpaHLA A2 DR1 Tg de nos collaborateurs. L'objectif est de déterminer quel modèle sera choisi pour le développement ultérieur de souris double humanisée foie (HU HEP mice) + système hématopoïétique (HIS mice) (modèle HIS HU HEP) ; modèle sensible aux infections par les virus hépatotropes et pouvant avoir une réponse immune contre le pathogène).

Nous allons étudier la réponse immune adaptative suite à l'injection d'un vaccin commercialisé dirigé contre le virus HBV (Hépatite B Humaine).

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

Ce projet est divisé en 3 procédures, 1) l'élevage de souris immunodéficientes NSG, 2) l'humanisation des souris (à partir de cellules souches hématopoïétiques humaines) et 3) caractérisation de la réponse immune suite à l'injection du vaccin.

Ce projet nécessite un maximum de 45 souris pour les 5 ans. (au maximum 3 projets de 15 souris pour avoir des données sur différents donneurs, 3 donneurs environ pour 15 souris, le but étant d'avoir environ 9 donneurs au final).

678- Les pathologies ischémiques sont une cause de morbidité et de mortalité importante au sein de la population mondiale malgré le développement et l'amélioration des prises en charge médicamenteuses et chirurgicales. En particulier, l'infarctus du myocarde (IM), consécutif à l'occlusion athéromateuse et/ou thrombotique d'une artère coronaire, est une des causes de décès les plus fréquentes dans les pays développés. Chez les patients ayant survécu à un événement ischémique initial, le myocarde subit un processus de remodelage délétère conduisant principalement à une dilatation précoce du ventricule et à un remplacement des cellules mortes par une zone fibreuse acellulaire. Si la taille de l'infarctus est importante, une insuffisance cardiaque congestive peut se développer. Ce remodelage s'accompagne d'une hypoperfusion tissulaire à l'origine, en partie, de la diminution de la fonction myocardique. Malgré les progrès des techniques de revascularisation endo-vasculaire et chirurgicale, des zones du myocarde souffrent toujours de cette hypoperfusion après l'infarctus.

La compréhension des mécanismes gouvernant le processus de néo-vascularisation spontané et les différents aspects du remodelage cardiaque, tout comme la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques, sont donc des enjeux majeurs de santé publique. En particulier, le développement de nouvelles approches basées sur la modulation spécifique de la réponse immuno-inflammatoire du cœur infarci représente une alternative d'intérêt dans le traitement des pathologies ischémiques. Pour ce faire, nous allons utiliser un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris (nombre total estimé de souris: 728). Ce modèle murin est une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes survenant au cours l'infarctus du myocarde. En effet, la réponse tissulaire à l'ischémie est un phénomène complexe multicellulaire impliquant plusieurs compartiments tissulaires, que des modèles in vitro ne pourraient pas permettre de recréer. Ces modèles murins précliniques sont également un préalable absolument nécessaire et incontournable pour la validation des stratégies thérapeutiques afin de les mettre en application chez des patients présentant un infarctus du myocarde.

Nous voulons, in vivo, comprendre les différentes interactions cellulaires, mais également tissulaires dépendante de la réaction immuno-inflammatoire qui sont mises en jeu au cours de l'infarctus du myocarde. L'objectif est de définir de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les cellules inflammatoires pour le traitement des patients présentant des cardiopathies ischémiques.

679- Le sujet de cette étude porte sur l'acide caprylique, qui appartient à la famille des acides gras saturés à chaînes moyennes. Ce groupe d'acide gras représente jusqu'à 10% des acides gras du lait de vache, jusqu'à 15% dans le lait d'autres ruminants mais est très peu présent dans le lait humain. Leurs utilisations dans l'organisme diffèrent de celle des acides gras à chaînes plus longues mais restent assez mal connues.

Les acides gras sont capables d'acyler des protéines, c'est-à-dire de se lier aux protéines. Il a été récemment découvert que l'acide caprylique peut acyler (octanoylation) une hormone, la ghréline. Cette réaction est catalysée par une enzyme : la Ghréline-O-Acyl-Transférase (GOAT). La ghréline est reconnue comme la seule hormone orexigène, c'est-à-dire stimulant l'appétit. Elle régule de nombreuses autres fonctions comme la sécrétion d'hormone de croissance (GH), la glycémie, l'adiposité. Pour être reconnue par son récepteur, la ghréline doit être activée sous sa forme octanoylée.

Le système ghréline-GOAT constitue une voie de signalisation pour informer le système nerveux central de la disponibilité en nutriments. Peu de données sont disponibles sur l'effet des acides gras alimentaires sur la régulation de l'acylation de la ghréline, mais il semblerait qu'il y ait un effet direct de la composition du contenu de l'estomac sur certains récepteurs impliqués dans le système ghréline-GOAT. L'acide caprylique est capable de rentrer dans les cellules de l'estomac, lieu principal de synthèse de la ghréline pour acyler cette hormone. Le but de l'étude est, ici, de voir si la dose d'acide caprylique ingérée a un effet sur les paramètres du système ghréline-GOAT notamment la prise alimentaire, l'adiposité, le métabolisme des lipides ou le maintien de la glycémie.

L'acide caprylique semble avoir un rôle ambigu : en tant qu'acide gras saturé à chaîne moyenne, il est rapidement métabolisé dans le foie comme source d'énergie et est donc peu stocké dans les tissus adipeux. Or, une fois fixé sur la ghréline, l'acide caprylique active la prise alimentaire, favorise l'adiposité et la prise de poids, voir l'obésité. Cette étude

visé à évaluer si la présence d'acide caprylique, notamment présent dans le lait, fortement consommé dans le monde (700 millions de litres consommés en 2012) peut influencer la régulation du système ghréline-GOAT et avoir un rôle sur la prise alimentaire et à terme, sur le développement de l'obésité.

Dans ce projet, on étudie pendant 6 semaines l'influence de la dose d'acide caprylique alimentaire (trois doses testées) chez 45 rats mâles âgés de 3 semaines (au sevrage), dans 3 situations nutritionnelles (régime normal, restriction calorique et régime hyperlipidique). Des prises de sang dans la veine latérale caudale seront effectuées hebdomadairement pour suivre les différents taux d'hormones plasmatiques (ghréline acylée et non acylée). Le nombre d'animaux dans chaque groupe est réduit au maximum, tout en gardant une puissance statistique suffisante. La prise de sang sera réalisée par du personnel qualifié qui veillera à limiter la souffrance et le stress de l'animal (faible volume prélevé, anesthésiant). Le poids des rats est mesuré tous les deux jours, afin d'être sûr qu'il y a bien une prise de poids régulière et suffisante chez tous les rats. A l'issue des 6 semaines de régime, les rats sont sacrifiés et les organes sont prélevés.

Cette expérimentation a pour but d'évaluer les besoins nutritionnels en acide caprylique chez l'Homme, car à ce jour, aucune donnée précise n'est actuellement disponible concernant cet acide gras. L'autre objectif de cette étude est de découvrir si la quantité de ghréline octanoylée est dépendante de la dose d'acide caprylique alimentaire.

680- La prévalence du surpoids et de l'obésité a augmenté très fortement ces dernières années dans la majorité des pays industrialisés. La principale raison est le déséquilibre énergétique avec un apport alimentaire supérieur aux dépenses énergétiques. Des études récentes ont montré qu'en plus de l'aspect nutritionnel quantitatif, l'aspect qualitatif au sein des lipides peut être impliqué dans la mise en place de l'obésité. En particulier, des études in vitro, ont mis en avant le rôle adipogénique de l'acide linoléique, précurseur des acides gras polyinsaturés de la famille des oméga 6.

Le projet consiste à étudier les effets d'une consommation excessive d'acide linoléique sur le métabolisme lipidique et glucidique ainsi que sur l'adiposité chez le rat Wistar. Deux régimes sont réalisés sur une base énergétique commune et classique pour le rat dont seule la nature des lipides varie. Les régimes sont réalisés à partir d'un mélange d'huiles commerciales et d'une base lipidoprive, sous forme de croquettes. Le régime A a une faible teneur en acide linoléique, proche des apports nutritionnels conseillés (ANC) chez l'homme tandis que le régime B a une teneur excessive en acide linoléique, proche de la consommation observée ces dernières années dans les pays industrialisés.

Afin de mimer une mise en place progressive de l'altération du tissu adipeux pouvant conduire à l'obésité, observée chez l'homme, l'étude se fait sur 2 générations de rats.

Prérequis : Une première partie de l'étude est réalisée au sein de l'élevage fournisseur. Cette partie de l'étude ne rentre pas dans la demande d'autorisation, l'élevage ayant soumis une demande d'autorisation à son propre comité d'éthique sur cette partie de l'étude. Dans cette première partie, 10 femelles gestantes Wistar sont nourries pendant 6 semaines avec le régime A ou B jusqu'au sevrage des 40 mâles. Les femelles nées et les mâles surnuméraires ne rentrent pas dans le projet.

Au laboratoire : Les rats sont livrés au sevrage de manière à ce que les régimes soient le plus rapidement administrés faisant suite directe aux régimes maternels. Les 40 mâles sont subdivisés en 4 groupes de 10 rats nourris avec le régime A ou B. On obtient ainsi 4 groupes distincts en fonction de l'alimentation des mâles et de l'alimentation des mères (AA-AB-BA-BB). Les rats sont nourris ad libitum jusque 3 ou 6 mois. Ces deux périodes doivent permettre d'évaluer la cinétique de l'altération du tissu adipeux, chez de jeunes adultes puis à un stade plus avancé.

Le projet a pour but d'améliorer la connaissance générale des lipides permettant ainsi de mieux comprendre les besoins nutritionnels chez l'homme et d'en prévenir les excès. En effet, l'approche biochimique et métabolique entre aujourd'hui en compte dans les évaluations et expertises de l'ANSES pour les définitions des ANC, en association avec les études épidémiologiques.

681- Ce projet de recherche est axé sur le rôle de la protéine matricellulaire appelée hevin dans la réponse au stress et aux drogues. Ces protéines interagissent avec la matrice extracellulaire et les cellules, régulant ainsi la fonction des neurones. Récemment, deux membres de cette famille ont été impliqués dans la dépression, la réponse aux antidépresseurs et la résilience au stress. Hevin est induit après un stress chronique social dans le noyau accumbens, centre de la récompense, uniquement chez les souris résilientes. De plus, sa surexpression chez les souris susceptibles est suffisante pour inverser l'aversion sociale. Ces observations, ainsi que d'autres données sur le rôle de hevin dans la synaptogenèse et sa présence au niveau des synapses excitatrices, suggèrent que cette protéine matricellulaire est impliquée dans la plasticité synaptique sous-tendant les émotions positives et la motivation. L'objectif de ce projet est de définir le rôle de cette protéine matricellulaire dans la réponse au stress et aux drogues. Malgré l'objectif d'utiliser des modèles cellulaires pour réaliser ce projet, les effets du stress et des drogues se produisent sur l'organisme entier. Les protocoles décrits dans ce projet sont donc essentiels pour mieux comprendre l'importance des événements moléculaires causés par le stress ou les drogues sur des circuits neuronaux intacts. Afin de réduire les duplicatas, le nombre de souris pour chaque étude a été déterminé à l'aide d'un programme statistique. Les études comportementales, biochimiques et anatomiques nécessiteront ~20, ~10 et 5 souris, respectivement (nombre total : 782 souris adultes du même fond génétique C57BL6/J, et 96 souris KO pour hevin). Afin de réduire le nombre d'animaux au maximum, différentes structures cérébrales à partir de chaque individu seront prélevées. Néanmoins, le mode d'action de hevin sera étudié sur des modèles de culture neuronale pour comprendre. Par des analyses comportementales, neuroanatomiques, pharmacologiques, moléculaires et génétiques, le plan du projet sera de comprendre :

1), dans quel type cellulaire hevin est induit et joue un rôle dans la résilience. Les taux de hevin seront manipulés dans les cellules en utilisant des souris transgénique Cre et des virus contenant la cassette flox-STOP, afin de tester hevin dans la résilience et les effets antidépresseurs.

2), cette approche anatomique et fonctionnelle sera étendue à d'autres comportements ayant une forte valence émotionnelle, en particulier la réponse à la cocaïne. Les effets de hevin sur la morphologie des épines dendritiques sera également étudiée.

3), les mécanismes contrôlant et régulant hevin dans des cultures primaires neuronales sera étudié en identifiant les partenaires de hevin par co-immunoprécipitation et analyse protéomique.

Les protéines matricellulaires représentent un nouveau courant de recherche qui peut amener à comprendre comment les individus s'adaptent au stress et aux drogues. Cette recherche est particulièrement novatrice et prometteuse. On est fondé à en attendre des bénéfices pour une meilleure compréhension des désordres psychiatriques tels que la dépression et l'addiction, mais également permettre une connaissance renouvelée de la plasticité et par la même des bases de l'apprentissage et de la mémoire.

682- Le traitement endovasculaire, par son caractère moins invasif et reproductible, est devenu le traitement de choix des dissections aortiques intéressant l'aorte thoracique descendante. La pose d'une endoprothèse couverte au niveau de la déchirure proximale de la dissection permet ainsi de rediriger le flux sanguin dans le vrai chenal, et de traiter la plupart des complications pouvant survenir à la phase aiguë. Cependant, l'existence d'autres portes d'entrée plus distales entraîne souvent une reperfusion en aval de l'endoprothèse, qui maintient un flux circulant dans le faux chenal de dissection, et favorise la dégénérescence anévrysmale de l'aorte thoracoabdominale à moyen terme. Afin d'éviter cette reperfusion distale du faux chenal, nous proposons d'associer un geste de fenestration rétrograde endovasculaire du flap de dissection aortique, afin d'obtenir une étanchéité au niveau de la portion distale de l'endoprothèse aortique : technique DEFINITE (Distal Endovascular Fenestration INside Thoracic Exclusion). Ce traitement combiné endovasculaire reste peu invasif, et devrait permettre de limiter l'évolution anévrysmale fréquente des dissections aortiques, ainsi que les complications souvent fatales qui lui sont liées. La transposition chez le mouton, d'un modèle de dissection déjà décrit chez le porc, pourra nous permettre d'évaluer les différents aspects techniques de l'exclusion du faux chenal de dissection par endoprothèse + fenestration. L'emploi d'un prototype de ciseaux de fenestration sera évalué sur ce modèle afin de vérifier l'intérêt d'une section active du flap de dissection. Un total de 20 moutons sera nécessaire à la mise au point du modèle de dissection, ainsi qu'à l'évaluation des différentes techniques de fenestration et d'exclusion par endoprothèse.

683- La paroi de *Candida albicans* est le point de contact entre la levure et l'hôte. C'est une structure complexe et dynamique contenant différents oligo et polysaccharides qui ne sont pas seulement importants pour son maintien mais qui ont également de nombreux rôles biologiques comme l'adhérence et l'immunomodulation. Parmi ces glycannes pariétaux, se trouve des oligomannosides présentant des liaisons β -1,2 mannosidiques (β -1,2 Mans) rares dans le monde vivant. Durant l'infection à *C. albicans*, les β -1,2 Mans jouent un rôle important dans les interactions hôte/pathogène en agissant comme adhésine et en interférant avec les réponses immunitaires de l'hôte. Des études ont montré que l'expression des β -1,2 Mans est hétérogène à la surface cellulaire, varie selon les souches de *C. albicans* et peut être modulée par différents facteurs environnementaux. Les β -1,2 Mans, qui sont biosynthétisés par une famille de 9 β -1,2 mannosyltransférases spécifiques du substrat et de l'étape de β -1,2 mannosylation, ont été trouvés associés à différents glycoconjugués : le phosphopeptidomannane (PPM), le phospholipomannane (PLM) et les mannoprotéines. De multiples mutants *bmts* Δ exprimant des β -1,2 Mans sur des glycoconjugués spécifiques ont été générés afin de déterminer le rôle respectif des glycoconjugués β -1,2 mannosylés dans les différentes étapes d'infection à *C. albicans*. Pour cela un modèle de colonisation digestive sera établi sur des souris BALB/c et C57BL/6(Gal3+/+ et Gal3-/-) avec une estimation par lignée murine de 5 animaux par souche de *C. albicans* (10 souches seront testées). L'estimation de la charge fongique sera évaluée dans les organes (estomac, intestin, caecum, côlon) après infection par les différentes souches. L'expression des gènes BMTs de *C. albicans* et des gènes murins codant pour les cytokines pro- et anti- inflammatoires sera également analysée dans les organes au cours de l'infection.

684- Le projet concerne l'élevage de poux de corps sur lapins. Les poux d'élevage sont à l'origine des poux de corps humains, qui ont été sélectionnés pour leur capacité à se nourrir de sang du lapin pour la survie et l'entretien de leur population. Le lapin est en effet, la seule espèce animale disponible pour cet élevage (à part l'homme). Dans le cadre de la Recherche Fondamentale et Appliquée sur quelques Ectoparasites et Acaricides (acariciens), principalement sur les Poux, nous possédons un élevage de poux qui nous permet de mieux connaître le pou et donc de mieux le combattre en contribuant à la mise au point de certains modes opératoires en étroite collaboration avec les industries pharmaceutiques et à la diffusion des connaissances nécessaires à la Lutte contre la pédiculose auprès des services scolaires, de santé et du public confronté à cette infestation: interventions dans les écoles, les Centres Aérés, conseils aux familles. L'élevage nous permet de mieux connaître les poux : le comportement, l'aptitude à la survie, l'acquisition de « résistance » à certains produits afin de mieux les combattre en conseillant et en testant l'efficacité pédiculicide et lenticide des produits anti-poux pour le compte de l'Industrie Pharmaceutique.

Pour cela nous utilisons 2 lapins sur une durée de 3 ans soit 4 lapins pour les 5 années du projet. A la fin des 3 ans, dans le respect de la règle des 3R, nous essayons de placer les lapins pour éviter de les euthanasier.

685- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre de prestations contractuelles pour le compte d'un client de BIOMEOSTASIS, qui développe des composés à visée commerciale dans le domaine du bien-être en gastroentérologie.

Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer les effets bénéfiques d'une série de 20 composés innovants (la dénomination des composés est sujette à accord de confidentialité), sur le temps de transit total ainsi que sur la fréquence d'émission et la qualité des fèces chez le rat sauvage en condition de constipation expérimentalement induite. A terme, les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société cliente de commercialiser des composés traitant un mauvais état de santé ou d'autres anomalies chez l'homme dans le domaine de la gastroentérologie.

Pour des raisons pratiques (capacités de gestion de l'étude et délais de production des composés du client), les 20 composés à tester seront traités par lots de 5, au cours de 4 études indépendantes menées sur 2 ans. Chacune de ces 4 études consistera en une phase initiale de traitement chronique (16j) par l'un des 5 composés à tester (5 groupes expérimentaux), par un composé de référence (1 groupe référence positive) ou par le véhicule (2 groupes contrôle - cf. plus loin). Les 3 derniers jours de traitement, les animaux entrent dans une seconde phase expérimentale pendant laquelle sera déterminé l'impact des différents traitements sur la fonction digestive (temps de transit total, fréquence d'émission et degré d'hydratation des fèces). Pendant cette phase de 72h, les animaux des différents groupes, à l'exception de 15 animaux du groupe contrôle, recevront un traitement connu pour induire un état de constipation modéré.

Les 15 animaux contrôle ne recevant pas ce traitement seront laissés en condition basales (non constipés) et constitueront ainsi un groupe contrôle du modèle de constipation expérimentalement induite.

Le projet est basé sur des procédures expérimentales peu invasives (voire non invasives) et le niveau de souffrance qui en résulte est par conséquent léger voire nul.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de la fonction digestive et de la qualité des fèces produites après un traitement chronique. Le modèle animal envisagé est un modèle rat (souche Wistar) qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude. Le choix du modèle rat a été validé avec le client qui possède déjà d'autres données expérimentales sur ce modèle et qui souhaite le conserver à des fins de comparaison et reproductibilité par rapport aux études antérieures.

Un total de 480 rats Wistar sera utilisé, divisé en 4 séries expérimentales utilisant chacune 8 groupes de 15 animaux (pour chacune des 4 séries : 5 groupes expérimentaux, 1 groupe référence positive, 2 groupes contrôles = 120 animaux). Le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé par une équipe de biostatisticiens à partir des résultats obtenus lors d'une étude pilote menée sur 15 animaux. Il a également été confirmé par une seconde étude complète menée sur 90 animaux.

686- La transplantation d'îlots aujourd'hui est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 et utilise le foie comme organe receveur de la greffe. En revanche, cette thérapeutique est proposée aux patients avec un diabète instable présentant des fluctuations glycémiques importantes. Ce fort déséquilibre glycémique est associé à l'activation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine de l'apparition de stress oxydant chez les patients diabétiques de type 1. Le stress oxydant joue un rôle majeur dans la physiopathologie du diabète et de ses complications. Peu d'études s'intéressent aujourd'hui au rôle du stress oxydant hépatique dans la perte de fonctionnalité des îlots post-greffe. Une étude antérieure au laboratoire nous a permis de caractériser le stress oxydant hépatique chez le rat diabétique de type 1 et de mettre en évidence l'implication majeure d'une enzyme pro-oxydante, la NADPH oxydase. Notre présent projet s'articulera ainsi en deux études. Tout d'abord, nous allons déterminer si l'administration par voie orale d'un inhibiteur de cette enzyme permet d'améliorer certains paramètres métaboliques et/ou oxydatifs chez le rat diabétique de type 1. La vitamine E (biodisponible au niveau du foie) sera utilisée en parallèle de cet inhibiteur pendant deux semaines et un mois de traitement. Les résultats de cette première étude permettront alors de proposer un traitement antioxydant bénéfique pour le foie. Notre deuxième étude se focalisera alors sur le potentiel effet bénéfique de ce traitement sur la réussite à court mais aussi à long terme de la greffe d'îlots. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respectée. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (230 rats mâles Lewis).

687- L'hippocampe est une structure corticale impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives (processus mnésiques, navigation spatiale, apprentissage). Il est principalement composé de deux types cellulaires : 80 % sont des neurones glutamatergiques et 20 % sont des neurones GABAergiques. Les activités de réseau de l'hippocampe apparaissent quelques jours après la naissance et évoluent pour devenir les vecteurs des fonctions cognitives chez l'animal adulte. Une des premières activités précoces du réseau hippocampique est orchestrée par des neurones GABAergiques « hub ». C'est-à-dire des neurones hyperconnectés capables d'influencer l'activité de centaines d'autres neurones. Une sous-population des neurones hubs sont des neurones pionniers, générés aux stades précoces de l'embryogenèse. Ces neurones hubs pionniers survivent chez l'animal adulte. Ce projet a en partie pour objectif d'étudier le rôle des neurones GABA hubs pionniers dans la physiologie de l'hippocampe chez l'animal adulte et de façon plus générale d'étudier le lien entre la date de naissance d'un neurone et sa fonction dans le cerveau adulte. En effet, il semble qu'une date précoce de genèse, confère au neurone

une place privilégiée dans l'organisation des activités de réseau chez le jeune animal. Ainsi, les neurones glutamatergiques de l'hippocampe générés le plus tôt ont une fonction « pacemaker » en l'absence de transmission inhibitrice.

Pour comprendre le rôle physiologique et pathologique des neurones pionniers (GABAergiques et glutamatergiques) nous utilisons une méthodologie pluridisciplinaire :

- l'imagerie biphoton calcique chronique in vivo à grande échelle permettant l'enregistrement simultané de l'activité de plusieurs centaines de neurones sur la souris éveillée libre de courir sur un tapis roulant.
- l'utilisation de lignées de souris transgéniques permettant d'identifier des neurones selon leur origine embryonnaire et leur date de naissance
- des enregistrements électrophysiologiques in vivo et un suivi vidéo du comportement de l'animal
- l'analyse mathématique de la dynamique des activités de populations de neurones.
- la stimulation optique permettant d'établir des relations causales entre l'activité des neurones et la dynamique du réseau.
- l'utilisation d'un modèle pathologique : l'épilepsie chronique du lobe temporal induite par injection de pilocarpine permettra de comprendre si les neurones pionniers ont un rôle pivot dans les réseaux cérébraux en conditions pathologiques.

L'ensemble de ces méthodologies pluridisciplinaires permet d'optimiser le nombre d'animaux engagés (N=1541) tout en améliorant la qualité des données complexes extraites des expériences, de générer des résultats statistiquement significatifs et renforcer la vraisemblance des conclusions scientifiques. La conception de ce projet a été articulée pour appliquer au mieux les principes de réduction et de raffinement.

688- L'alimentation de l'animal a un impact fort sur la qualité nutritionnelle des produits car il existe une relation entre les acides gras (AG) ingérés et ceux déposés dans le lait, la viande ou les œufs. Des études précédentes ont permis de montrer qu'il était possible d'améliorer la qualité nutritionnelle de la viande, du lait et des œufs en introduisant dans l'alimentation de l'animal des acides gras jugés intéressants pour la santé humaine.

L'amélioration de l'efficacité du transfert des AG de l'aliment des animaux à l'aliment des hommes via les produits animaux constitue une piste de recherche intéressante. C'est aussi un aspect important sur le plan économique dans la mesure où il conditionne le coût final du produit. Différentes voies peuvent être envisagées pour améliorer cette efficacité. Elles passent par l'amélioration de techniques existantes ou encore par la recherche de techniques innovantes, par exemple de nouvelles sources d'AG essentiels (oméga 3). Ceci justifie l'intérêt de poursuivre des études sur l'effet des facteurs d'élevage (principalement alimentaires) sur la qualité nutritionnelle des produits animaux tout en préservant, voire en améliorant leurs qualités sensorielles et leur acceptation par le consommateur en maîtrisant leur impact environnemental.

Deux voies innovantes d'amélioration de l'efficacité de transfert des AG oméga 3 dans les produits animaux seront étudiées dans ce projet. La première s'inscrit dans le prolongement des approches précédentes. Elle consiste à tester une nouvelle technique de traitement des graines de lin qui permet de séparer la pellicule, mieux valorisée par les ruminants, de l'amande, mieux valorisée par les monogastriques. La seconde approche consiste à tester l'utilisation d'algues comme source d'AG oméga 3 plus riches en AG polyinsaturés longues chaînes.

Ces nouveaux aliments seront testés sur 3 espèces de rente : poulet de chair, porc et vache laitière. Ce projet concerne la vache laitière. Trois nouveaux aliments seront testés : les pellicules de la graine de lin, l'amande de cette graine et des microalgues.

Ce projet respecte au mieux la règle des 3 R : je réduis au maximum le nombre d'animaux et je raffine la méthodologie en ne faisant pratiquement que des prélèvements de lait à la traite.

689- L'infarctus du myocarde constitue une urgence cardiologique dont l'incidence reste élevée avec 120 000 cas par an en France. Lors d'un infarctus, il y a occlusion des artères coronaires et le myocarde ne reçoit plus de sang, les cellules manquent d'oxygène, elles sont en ischémie. Il en résulte une nécrose d'une zone plus ou moins étendue du muscle cardiaque. Le myocarde ne parvient plus à se contracter correctement, il en résulte l'amincissement de la paroi et la disparition des cellules.

Nous proposons une thérapie, l'ingénierie tissulaire, qui permettrait de remplacer le tissu défaillant devenu fibrotique par injection in situ d'un implant de type Poly Acide Lactique-co-Glycolique (PLGA) contenant du S-Nitrosoglutathion (GNSO), connu pour son action favorable sur les cellules cardiaques.

Le projet a pour objectif de démontrer l'innocuité du polymère et sa valeur thérapeutique dans le traitement de l'infarctus du myocarde chez le rat Wistar han.

Le modèle d'infarctus du myocarde chez le rat est utilisé pour sa similitude avérée avec les processus physiologiques se déroulant chez l'homme. Ce modèle permet de prendre en compte l'organisme dans son entier et de reproduire toutes les interactions existantes dans cette pathologie chez l'homme (remplacer).

La souche Wistar han est choisie pour sa résistance physique lors de la mise en place du modèle d'infarctus.

30 rats seront répartis en 3 groupes :

1- groupe 1 : rats recevant l'implant PLGA seul

2- groupe 2 : rats recevant le GNSO seul

3- groupe 3 : rats recevant l'implant + GNSO

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffiner).

Les résultats attendus seront (1) une réhabilitation tissulaire avec une augmentation de la viabilité et une diminution de la zone infarctée et (2) une amélioration fonctionnelle cardiaque.

Les techniques d'évaluation utilisées seront :

- pour la viabilité : l'imagerie médicale (examen par tomoscintigraphie)

- pour la fonction cardiaque : le cathétérisme millar (mesure pression-volume)

Le nombre d'animaux (n=30) a été calculé d'après notre expérience du modèle (mortalité maximale de 20%) afin d'obtenir des groupes statistiquement exploitables (réduire).

690- L'hypercholestérolémie familiale est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires, première cause de mortalité/morbidité dans les pays occidentaux. Elle est provoquée par des mutations de certains gènes (récepteur des LDL ou LDL-R, apo B100), et PCSK9 (pro-protéine convertase subtilisine kexine-9), dont le rôle a été découvert récemment par une équipe INSERM. PCSK9 est actuellement une nouvelle cible thérapeutique pour les hypercholestérolémies familiales et il est primordial de bien connaître son mécanisme de fonctionnement.

L'objectif de notre équipe est d'étudier in vivo les effets métaboliques de la mutation p.R357H de PCSK-9, chez des souris transgéniques générées précédemment avec l'aide financière de deux contrats ANR: ANR-06-MRAR-038-01 (2006 à 2008) et ANR-08-GENO-002 (2009 à 2012). Nous avons étudié l'impact de la mutation p.R357H de PCSK-9 chez des souris transgéniques classiques (la lignée N générée dans le Plateau de Transgénèse du Centre de Recherche des Cordeliers ou CRC) et des souris Knock-In (KI) de ce mutant (générées par la Clinique de la Souris de Strasbourg). Ces souris sont élevées au CEF et génotypées par PCR. Nous avons montré que ces deux lignées N et KI ne présentent aucune modification de leur métabolisme lipidique après un gavage d'huile ou après 2 mois de régimes hyperlipidémisants.

Afin de mimer au plus près les conditions d'hypercholestérolémie familiale chez l'homme, nous avons croisé les deux lignées transgéniques (N et KI) avec une lignée double transgénique "humanisée" présentant une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie à l'état basal. En effet, ces souris expriment le gène de l'apo B100, la protéine de structure des LDL, et le gène de la CETP (cholestérol ester transfert protéine), qui transfère le cholestérol sur les VLDL et les LDL; elles sont appelées BC. Nous utiliserons donc deux lignées de souris triple-transgéniques: la lignée BC-N (provenant de la lignée N croisée avec la lignée BC) et la lignée BC-KI (provenant de la lignée KI croisée avec la lignée BC). Ces souris sont élevées au CEF et génotypées par PCR pour les 3 gènes concernés.

Dans le projet présenté aujourd'hui nous étudierons le rôle de la mutation p.R357H de PCSK9 dans le modèle de souris hypercholestérolémiques BC-N et BC-KI sur :

(1) le profil des lipoprotéines

(2) le métabolisme post absorptif des lipides après un gavage lipidique

(3) le captage des LDL par le foie, l'organe principal de leur catabolisme.

Nous obtenons une réduction du nombre de souris nécessaire pour les expériences en utilisant les mêmes souris adultes pour l'élevage et l'expérimentation. Le sexe déterminant en partie les paramètres lipidiques des souris humanisées, cette étude sera réalisée sur un total de 168 souris (2 sexes x 2 lignées triple-transgéniques et 4 lignées témoins).

Le remplacement est impossible car les lipoprotéines sont métabolisées in vivo par tous les tissus.

Ce modèle de souris triple transgéniques humanisées et la qualité des conditions d'élevage et d'expérimentation offrent un bon niveau de raffinement au projet et devraient nous permettre de conclure si cette mutation de PCSK9 est ou non.

691- Objectif du projet: Evaluer l'activité toxicologique in vivo de nouvelles entités chimiques, destinées à être administrées chez l'homme, après injections répétées par voie intraveineuse chez le miniporc de la souche Göttingen®. En effet, les programmes d'évaluation de la sécurité non clinique doivent normalement comprendre deux espèces pertinentes et les espèces animales retenues sont choisies pour leur capacité à prédire le mieux possible les effets secondaires. Il s'agit essentiellement de rongeurs (rat - souris) et d'espèces non-rongeur (ici le miniporc).

Avantages: La procédure expérimentale mise en œuvre permet de documenter précocement l'activité toxicologique in vivo du produit d'intérêt et de définir une dose sans effet indésirable reliée à un niveau d'exposition dans les organes et tissus cibles. Aussi le choix de la voie intraveineuse permet de mieux rendre compte des effets éventuels du produit dans le compartiment sanguin, tout en s'affranchissant des éventuels problèmes de faible biodisponibilité (par rapport aux autres voies d'administration). Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates et au choix des doses à utiliser plus tard chez l'homme pour les indications thérapeutiques ciblées.

Domages escomptés: En fonction des cibles toxicologiques, et en accord avec les guidances réglementaires internationales, il est toujours nécessaire de documenter au préalable des études cliniques la toxicité du produit sur l'animal. La sélection de points limites appropriés (eu égard à la molécule testée) et l'utilisation d'un produit analgésique (si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux) seront prévues dans ce projet.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode in vitro validée scientifiquement ou test réglementaire reconnu par la législation de l'Union Européenne qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de toxicologie et de toxicocinétique adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux, conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: L'espèce miniporc (souche Göttingen[®]) sera utilisée en raison de l'abondance de littérature sur ce modèle et de l'existence des outils d'analyses ex vivo spécifiques de ces espèces comme par exemple les examens de laboratoire (hématologie - biochimie plasmatique et urinaire et analyse des paramètres de coagulation).

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (réponses cliniques et biologiques) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, 1 à 4 animaux par groupe expérimental jusqu'à 6 si une analyse de la réversibilité des effets est prévue) seront utilisés pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés.

Le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée. Le nombre maximum de miniporcs envisagé dans la procédure expérimentale incluse dans ce projet est de 54 animaux. Sur la base de cette procédure, pouvant être réalisée maximum 5 fois par an, un total maximum de 1350 animaux pourra être utilisé sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité total accord avec les législations française et européenne.

692- Le rôle essentiel des plaquettes sanguines est l'arrêt des saignements dans les vaisseaux de petits calibres, suite à une lésion vasculaire, lors d'un processus physiologique que l'on appelle l'hémostase primaire. Leurs propriétés reposent sur des fonctions majeures que sont l'adhésion, la sécrétion et l'agrégation. Les plaquettes sanguines présentent à leur surface un complexe glycoprotéique majeur, constitué de 4 glycoprotéines (GPIb α , GPIb β , GPIX et GPV), le complexe GPIb-V-IX. Suite à une lésion vasculaire ce complexe se lie à son ligand, le facteur von Willebrand, exposé par la matrice extracellulaire et permet le ralentissement des plaquettes normalement entraînées par le flux sanguin. Les plaquettes peuvent alors adhérer de manière stable, sécréter le contenu de leurs granules et recruter d'autres plaquettes formant ainsi un clou plaquettaire favorisant l'arrêt des saignements. Le complexe GPIb-V-IX joue un rôle clé en hémostase puisque un déficit quantitatif ou qualitatif de ce récepteur se traduit par un syndrome hémorragique: le syndrome de Bernard-Soulier caractérisé par une diminution du chiffre plaquettaire, des plaquettes de grande taille et un temps de saignement allongé. En plus d'un rôle bien établi de ce complexe dans l'adhésion, sa capacité à déclencher une activation intra plaquettaire a également été mis en évidence. Il a été démontré au laboratoire, à la suite de transfection de cellules d'ovaires de hamster, que les domaines intracellulaires des glycoprotéines GPIb α et GPIb β puissent intervenir dans cette signalisation et notamment, nous avons identifiés des portions et des résidus clés sur chacune des glycoprotéines. Le but de ce projet est d'évaluer la fonction de ces domaines ex vivo et in vivo. Pour cela nous proposons de réintroduire le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX muté ou sur des domaines intracellulaires ou des résidus ponctuels choisis de la GPIb α ou la GPIb β dans des souris déficientes pour chacune de ces glycoprotéines. Nous étudierons sur le complexe GPIb α 2 mutants et 1 contrôle ce qui nécessitera un total de 216 souris. Concernant la GPIb β , nous utiliserons 4 conditions d'étude, soit 288 souris.

693- L'objectif de ce projet est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des causes génétiques et épigénétiques des déficiences intellectuelles (DI) et de l'autisme en étudiant la fonction des gènes impliqués dans ces pathologies. L'autisme et les DI sont deux troubles sévères du développement du système nerveux central (SNC) et représentent un problème majeur en santé publique car leur prévalence respective est estimée actuellement à au moins 1% de la population générale. Ces 2 pathologies ont une origine biologique démontrée et l'implication majoritaire de facteurs génétiques a été bien établie durant les 20 dernières années. Cependant, les mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus, malgré les développements technologiques récents. Les gènes candidats (entre 300 et 500) s'expriment durant le développement précoce du cerveau et afin de mieux comprendre leur rôle au sein de la cellule neuronale, nous souhaitons disposer d'un modèle cellulaire in vitro ayant les conditions les plus proches de celles retrouvées au cours de la formation du cerveau. En effet, l'impossibilité évidente de prélever des échantillons de cerveau

chez l'homme au cours de sa vie ne permet pas d'étudier les conséquences des altérations génétiques durant le développement du SNC sur le développement des connexions neuronales.

Afin de disposer d'un système permettant de contourner cet obstacle majeur, le modèle de choix, qui est reconnu depuis une vingtaine d'années et couramment utilisé en neurobiologie, est la culture primaire de neurones embryonnaires de rongeur (souris, rat) extraits de différentes régions cérébrales connues pour être impliquées dans les fonctions cognitives, de la mémoire et de la communication (hippocampe, cortex, cervelet). Ces cultures sont préparées suite à l'euthanasie de femelles gestantes souris ou rat, et des embryons au stade gestationnel compris entre E14 et E18. Les tissus cérébraux sont prélevés sur les embryons puis mis en culture.

Ce projet d'une durée de 5 ans utilisera un nombre de 100 femelles gestantes par année, soit 500 animaux (400 souris, 100 ratées). Cet effectif a été optimisé afin de disposer de tissu cérébral de manière régulière pendant toute la durée du projet. Le nombre moyen d'embryons par femelle gestante étant de 7-8, un total maximal de 3500-4000 embryons (stades E14-E17) seront utilisés durant cette période, avec des protocoles d'euthanasie appropriés limitant au maximum la douleur et la souffrance des animaux. Ce système de culture est actuellement le seul pouvant récapituler en conditions in vitro toutes les étapes du développement in vivo du SNC et cela de manière identique en fonction du temps: neuritogenèse (J0-J3), dendritogenèse (J3-J6), synaptogenèse (J7-J11), maturation (à partir de J12). Il n'existe aucune autre méthode alternative à ce jour. En outre, ce modèle, qui n'est pas nouveau, est utilisé en routine en recherche neurobiologique et dans de très nombreuses publications pour la compréhension du fonctionnement du cerveau en conditions normales et pathologiques chez les rongeurs.

694- La finalité de notre travail est le développement d'un produit d'ingénierie tissulaire destiné à la régénération de tissu colorectal permettant de répondre à des besoins cliniques majeurs en chirurgie digestive.

La chirurgie colorectale (après cancers, fistules pelviennes, maladie de Crohn...) nécessite de disposer d'outils pour renforcer les sutures. En effet les « fuites de suture » dites fistules anastomotiques constitue une complication majeure de cette chirurgie à l'origine d'une mortalité importante. L'objectif de ce projet est de tester des « plaques de matériel biologique ou matriceensemencées de cellules » qui facilitent la cicatrisation.

Ce travail constitue une étape indispensable dans le cadre d'un projet global de remplacement rectal par ingénierie tissulaire où les caractéristiques anatomiques et fonctionnelles du substitut rectal autologue doivent être aussi proches que possible de celles du réservoir rectal natif permettant une reconstitution ad integrum de cet organe. Ce concept a récemment fait l'objet d'applications cliniques dans le remplacement de la vessie ou le remplacement trachéobronchique. Ce type de remplacement ne nécessite pas d'immunosuppression, compte tenu du caractère acellulaire de la trame extracellulaire et de la nature autologue des cellules greffées.

Le projet de recherche soumis est en cohérence avec les 2 premières années de recherche qui nous ont permis de sélectionner une matrice d'origine biologique à partir d'études in vivo (lapins) et in vitro dans son aptitude à favoriser la régénération tissulaire colorectale. Cette matrice non cellularisée a été implantée sur 10 porcelets large white au niveau d'un trou réalisé sur le colon de 3x2 cm avec des résultats très encourageants.

L'objectif de cette 3ème année, objet de cette demande, est d'évaluer l'apport de la cellularisation de cette matrice sur la cicatrisation du colon. Le protocole comprend donc 10 porcelets de 40 Kg chez lesquels sera réalisé un trou dans le colon de 3x2 cm, fermé par une matrice identique aux 10 premiers porcelets mais qui sera cellularisée avec des cellules issues du gras du porc (ensemencement autologue : le porc reçoit ses propres cellules). Les porcelets seront euthanasiés à 2 mois selon le même protocole afin d'effectuer le prélèvement de la zone de greffe pour analyse.

Aucune méthode alternative à l'expérimentation animale ne peut répondre à la question posée.

Le modèle porcin a été choisi sur les arguments suivants :

- la structure anatomique et cellulaire, ainsi que la physiologie de l'animal, sont très proches de l'homme,
- la validité du modèle pour l'étude des fistules coliques ou colorectales dans sa capacité à mimer la réaction du modèle humain face à la même agression,
- l'isolement et la mise en culture de cellules du tissu adipeux (gras) pour d'autres applications chez le porc, dont les caractéristiques sont semblables à celles rapportées chez l'homme et validées dans notre laboratoire.

Afin de respecter la règle des 3 R, le nombre d'animaux utilisés constitue le seuil minimal permettant une comparaison statistique des 2 groupes (année 2 et année 3) sur des données histologiques et immuno-histologiques.

695- L'objectif de ce projet est d'identifier des composés chimiques ou biologiques qui pourraient être développés comme nouveaux médicaments dans le traitement de la sclérodémie généralisée. La sclérodémie est une maladie rare du tissu conjonctif qui se manifeste d'abord au niveau de la peau par des lésions fibreuses, mais qui évolue lentement vers une forme plus généralisée avec atteinte des articulations, des viscères et plus spécifiquement de l'œsophage, des poumons, des intestins, du cœur et des reins. L'atteinte des poumons, du cœur et des reins conduit inexorablement à une forte morbidité et mortalité, en l'absence de traitement efficace de la maladie.

Pour réaliser ce projet, un travail important est réalisé au préalable in vitro sur des cellules humaines, afin de sélectionner les meilleures molécules à progresser. Etant donnée la complexité des mécanismes impliqués dans cette pathologie, il est difficile de prédire le potentiel thérapeutique d'une molécule uniquement sur la base de résultats in vitro. Il s'avère donc

nécessaire d'utiliser un modèle animal qui reproduit au mieux les différents aspects de la pathologie humaine, afin de pouvoir évaluer in vivo les meilleurs composés identifiés.

Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris car l'induction chimique de la sclérodémie sur cette espèce est bien documentée dans la littérature. La majorité des animaux utilisés dans ce projet seront exposés à des injections répétées d'un produit chimique déclenchant une inflammation dans la peau et dans les poumons principalement, avec pour conséquence l'apparition d'une fibrose dans ces deux tissus en quelques semaines. Les signes cliniques attendus sont modérés (perte de poids consécutive à l'exposition à l'agent chimique). Tout signe clinique anormal fera l'objet d'une surveillance vétérinaire afin d'éviter une souffrance sévère à l'animal.

Une analyse bio-statistique des données générées dans ce modèle rongeur sera réalisée après la première étude pilote, afin d'inclure le minimum requis d'animaux par groupe pour obtenir une réduction significative de 50% de la fibrose dermique et pulmonaire. L'utilisation des données publiées dans la littérature sur ce modèle animal nous guidera dans un premier temps pour déterminer le nombre minimal d'animaux à inclure par groupe.

Pour ce projet, on peut estimer 2000 souris utilisées au maximum.

696- L'objectif est de caractériser les conséquences d'une pratique courante autorisée en élevage porcin : la coupe de queue. Elle est réalisée sur recommandation vétérinaire dans les élevages dans lesquels des cas de caudophagie ont été observés. La caudophagie peut causer une perte jusqu'à 30% dans certains pays européens. La coupe de queue induit des réponses comportementales et physiologiques de douleur jusque dans les heures qui suivent, mais peu d'observations ont été faites à long terme. L'Europe a donc démarré un programme de recherches sur ce thème, en vue de développer des pratiques plus respectueuses du bien-être animal.

Le projet présenté, de sévérité légère, pourra nous donner les clés pour proposer des alternatives qui pourraient palier à la coupe de queue, en évitant les dommages liés à la non-coupe de queue.

Nous étudierons la réaction à la coupe de queue ou à la manipulation sur 144 porcelets, puis suivrons 6 groupes de 8 animaux à la queue coupée et 6 groupes de 8 animaux à la queue non coupée. C'est le nombre de groupes minimum pour avoir une représentativité de la variabilité que l'on puisse tester statistiquement. Chaque semaine, leur comportement spontané dans leurs groupes sera relevé. Trois animaux par groupe seront testés dans un environnement nouveau en présence d'un homme non familier afin de mesurer la réaction aux humains. Finalement, un prélèvement salivaire (cortisol) et un prélèvement de sang (β -endorphine) seront réalisés afin de faire un bilan de l'état de « stress » induit par la douleur potentiellement ressentie. Il n'est pas possible de mettre en place de méthode de substitution qui évite l'emploi d'animaux vivants.

La moitié des porcs seront soumis à la coupe de queue avec un coupe-queue thermique qui permet de cautériser la plaie dans le respect de la réglementation en vigueur. La procédure est pratiquée en routine dans les élevages de porcs commerciaux. La coupe de queue et les procédures expérimentales seront effectuées par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène et de sécurité et en minimisant les risques de stress et de douleur pour les animaux par une manipulation et une surveillance adaptée.

Tout au long du projet, les animaux seront suivis quotidiennement au moment des repas par les personnes en charge de l'expérience ou les animaliers formés pour l'expérimentation animale. Tout animal souffrant sera soigné en fonction de son état, selon les conseils vétérinaires. Si la coupe de queue ou la caudophagie induisent des blessures ouvertes, les plaies seront désinfectées et la blessure sera pulvérisée de répulsif spécial pour éviter l'approche des autres animaux. Si la blessure n'évolue pas positivement, l'animal sera isolé du groupe pour le préserver. Si (très peu probable) un animal venait à développer une infection, à ne plus s'alimenter pendant plus de 24h, le vétérinaire conseil de la structure chargé du bien-être animal serait consulté pour avis. L'animal serait traité selon ces conseils, voire euthanasié par électroanesthésie suivie de saignée.

697- Le cancer reste une pathologie en très forte progression, tant par son incidence, sa mortalité que les coûts associés. Il accroît fortement la pression sur les systèmes de santé, avec des coûts quantifiés en centaines de milliards de dollars dans les pays occidentaux. Rien qu'en France, ils atteignaient près de 40 milliards de dollars en 2004.

En parallèle, les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces, avec un taux de réponse moyen d'environ 20%, et évoluent vers les thérapies ciblées plus spécifiques, avec un rapport efficacité/effets secondaires bien plus bénéfique pour les patients. Néanmoins, l'efficacité des traitements même ciblés et surtout du diagnostic en oncologie restent encore insuffisants.

Notre programme s'inscrit dans la dynamique actuelle de la progression vers la médecine personnalisée et dans un contexte d'importants besoins non-satisfaits en oncologie, tant en termes cliniques, économiques que de l'optimisation du processus de développement de nouvelles thérapies. Ce programme propose une approche résolument innovante en répondant aux challenges actuels au travers des outils d'imagerie moléculaire.

En effet, l'amélioration de l'efficacité clinique mais aussi économique des thérapies ciblées reste conditionnée par le développement de biomarqueurs spécifiques permettant un diagnostic précoce, l'identification des patients répondeurs, la rationalisation des traitements et l'évaluation de leur efficacité.

L'imagerie moléculaire permet de quantifier les biomarqueurs de manière non invasive.

La TEP (tomographie par émission de positons) en particulier est la technologie la plus sensible et adaptée pour quantifier des molécules mais son usage reste aujourd'hui limité par le nombre de radiotraceurs disponibles et par leur faible spécificité.

Pour répondre à ces besoins, notre programme propose de développer de nouveaux radiotraceurs TEP de très haute spécificité ciblant les cellules cancéreuses ou des processus biologiques typiquement dérégulés dans les tumeurs et/ou les métastases.

Ces traceurs visent typiquement les mêmes cibles que les nouveaux composés à visée thérapeutique actuellement en développement, et ont le potentiel d'accompagner ces nouveaux médicaments de plusieurs manières :

- Diagnostic des cancers
- Identification de patients dans lesquels le traitement a une meilleure chance d'être efficace
- Suivi de l'efficacité des traitements
- Identification et suivi de l'apparition de résistances aux traitements.

Chaque année, environ 200 animaux, comprenant des rats et des souris adultes seront utilisés dans ce programme. Pour tester un nouveau traceur, 5 études sont nécessaires, avec un total de 40 animaux/étude (2 lots d'animaux/étude). Nous envisageons de tester 1 traceur/an (10 lots/an), soit un total de 600 animaux sur toute la durée du programme.

Les expériences d'imagerie non invasives, réalisées sur une partie des animaux inclus, permettent d'en réduire le nombre.

698- Les microARN (miARN) sont de courtes molécules d'ARN non-codantes capables de réguler négativement l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Chez les animaux, les miARN s'apparient de manière imparfaite avec des ARNm, préférentiellement au niveau de leur région 3' non-traduite, et par des mécanismes divers et encore imparfaitement élucidés, ils inhibent la traduction voire provoquent la dégradation de l'ARNm-cible. Ces dernières années, de nombreuses études ont mis en avant le rôle majeur des miARN dans le contrôle de l'expression des gènes chez les animaux, et ce virtuellement dans tous les processus biologiques qui ont été examinés, notamment en modulant la prolifération cellulaire, l'identité cellulaire et l'apoptose. Il faut néanmoins bien admettre que l'importance physiologique de telles régulations demeurent encore peu comprises, et ce notamment chez les mammifères pour lesquels les études sur les modèles murins génétiquement modifiés restent encore limitées.

Notre projet de recherche concerne plus de 50 miARN dont les gènes sont physiquement regroupés et positionnés au locus *Dlk1-Dio3* sur la partie distale du chromosome 12 murin. C'est le cluster miR-379/miR-410 - aussi nommé C14MC chez l'homme - dont l'expression est régulée par l'empreinte génomique parentale, un phénomène épigénétique complexe qui conduit à une expression mono-allélique des allèles en fonction de leur origine parentale. En ce qui concerne le cluster miR-379/miR-410, son expression est restreinte à l'allèle maternel.

L'objectif majeur de notre programme de recherche porte sur les fonctions physiologiques du cluster miR-379/miR-410 qui est retrouvé uniquement chez les eutheriens (mammifères placentaires). Il s'appuie sur l'exploitation d'un modèle murin knock-out (KO) original dans lequel nous avons généré une délétion ciblée (Δ miR) qui invalide, de manière constitutive, l'intégralité du cluster de miARN. L'empreinte étant propre aux mammifères placentaires, le choix d'utiliser la souris en tant que modèle est incontournable. C'est en effet la seule espèce de mammifères pour laquelle la manipulation de l'expression des gènes est réalisable de manière relativement aisée.

Nos données non publiées indiquent que le cluster miR-379/miR-410 joue un rôle important dans la survie en période périnatale, notamment en contrôlant l'adaptation métabolique à la vie extra-utérine. Fait important, le phénotype n'est pas totalement pénétrant: 35% des souriceaux meurent 24-48h00 après mise bas.

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

Différentes études de caractérisation, de performance et de sécurité sont ainsi exigées lors du développement d'un nouveau dispositif médical avant toute obtention du marquage CE et donc de la mise sur le marché du nouveau produit. Notre structure développe un produit hémostatique. Afin de tester son efficacité et sa maniabilité, un protocole de recherche non clinique est mis en place. Deux indications chirurgicales sont visées : les chirurgies digestives et spinales. Des tests *in vitro* ont été réalisés dans les phases précédentes de conception du produit. La phase préclinique animale permettant de placer le produit en condition standard d'utilisation chirurgicale s'avère nécessaire à ce stade de développement du produit.

Le protocole implique la mise en œuvre de l'espèce animale porcine pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cette espèce est largement décrite comme étant un modèle adapté d'évaluation de propriétés hémostatiques (paramètres cardio-vasculaires approchant de ceux de l'homme). Enfin, afin d'évaluer la maniabilité du produit, une espèce de taille suffisante doit être mise en œuvre (évaluation de l'accessibilité de sites anatomiques profonds, surfaces de tissus disponibles adaptées au protocole). Dans un premier temps, deux animaux sont inclus dans le protocole, l'un pour le modèle hépatique, l'autre pour le modèle spinal. Pour des raisons de durées de chirurgie et par conséquent d'instabilité des paramètres de coagulation, il n'est pas possible de coupler les évaluations des deux indications sur un même animal. A priori, des modifications techniques devront être amenées suite aux premiers essais. Dans un second temps, deux animaux seront inclus dans le protocole (mêmes indications et protocole), afin de valider les modifications techniques apportées.

L'efficacité du produit hémostatique en développement sera comparée à celle 2 produits disponibles sur le marché et à celle d'une méthode conventionnelle d'hémostase. Les modèles chirurgicaux sont standardisés et reproductibles. L'évaluation des critères d'efficacité se base sur une méthode publiée dans la littérature scientifique. Une courte analyse statistique pourra être réalisée. Les protocoles chirurgicaux sont réalisés par des chirurgiens spécialisés dans l'indication visée, et habilités à l'expérimentation animale.

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

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

Concernant le raffinement, des procédures analgésiques et anesthésiques ont été intégrées au protocole expérimental permettant de suivre et de prévenir tout signe de mal-être animal. La procédure d'euthanasie des animaux en fin de chirurgie est une procédure standard, réalisée dans le respect de l'éthique préclinique.

700- Les plaquettes sanguines formées dans la moelle osseuse jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour comprendre la fonctionnalité des plaquettes et leur mode de production. La possibilité de pouvoir manipuler les gènes murins a fait de la souris un modèle extrêmement informatif concernant d'une part les fonctions de ces gènes et d'autre part la possibilité de mimer des maladies humaines en vue de leur étude. Les souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle d'un promoteur spécifique des plaquettes (lignée PF4-Cre) est très largement utilisée dans la communauté scientifique pour reproduire chez la souris des mutations génétiques humaines uniquement dans les plaquettes sanguines. Malgré cela ces souris restent encore peu caractérisées. Ce projet a pour objectif de caractériser la souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur PF4 afin de pouvoir tirer les conclusions les plus rigoureuses possibles dans les modèles faisant appel à cette lignée de souris et ainsi minimiser à l'avenir le nombre total d'animaux utilisés par étude. Dans ce but, la lignée murine « PF4-cre » sera croisée avec une lignée de souris rapportrice pour déterminer les éventuelles recombinaisons génétiques qui pourraient se produire en dehors des plaquettes ce qui pourrait conduire à une interprétation erronée des résultats expérimentaux. Ce projet d'une durée de 1 an fera appel à 51 souris ayant toutes un fond génétique C57Bl/6.