



**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 (8)

701- Les mécanismes impliqués dans la différenciation normale des cellules permettent de mieux comprendre comment celles-ci sont dérégulées dans les processus pathologiques.

- La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). La transformation maligne produit des cellules non fonctionnelles car bloquées à un stade immature, cela entraîne une insuffisance médullaire.

La LAP peut être soignée par l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) qui induit la maturation des cellules malignes. Les traitements reposent sur l'association de la chimiothérapie (ayant des effets toxiques et un risque accru de développement des leucémies secondaires et des syndromes myélodysplasiques pouvant entraîner une insuffisance cardiaque permanente), avec l'ATRA et des soins de soutien. Néanmoins, 20% des patients rechutent. La compréhension des fonctions et des mécanismes d'actions de la protéine ASB2 est une étape importante pour comprendre comment la myélopoïèse est dérégulée dans les cellules leucémiques. Caractériser l'expression d'ASB2 dans les cellules hématopoïétiques immatures pour ensuite étudier la fonction d'ASB2 dans ces cellules nous permettra d'envisager de nouveaux traitements pharmacologiques pour les patients atteints de leucémie.

- Les cellules dendritiques participent à la lutte contre la progression tumorale. Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans l'activation de la réponse immunitaire primaire. ASB2 qui est exprimé dans les cellules dendritiques immatures est un régulateur de la motilité de ces cellules, ce qui en fait une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les cellules dendritiques. Compte tenu de ces résultats et de l'importance des cellules dendritiques dans la réponse anti-tumorale, il est essentiel d'étudier l'implication d'ASB2 dans le développement des tumeurs et le processus métastatique in vivo chez la souris.

Le but de ce projet de recherche est d'étudier la fonction d'ASB2 dans les cellules sanguines et dans les cellules musculaires afin de développer à plus long terme de nouvelles approches thérapeutiques. Pour cette étude, le modèle de choix est un modèle de souris invalidées pour le gène ASB2 qui ont été initialement générées à l'Institut clinique de la souris (Illkirch). En effet, aucun modèle cellulaire in vitro ne permet de mener les études proposées; seules des études fonctionnelles in vivo permettront d'établir le rôle d'ASB2 dans les cellules sanguines et musculaires. Dans ce contexte, la souris étant l'espèce animale la plus étudiée dans les différents laboratoires pour ces problématiques, notre choix se porte logiquement vers ce modèle. D'autre part, la souris est le modèle de choix pour l'invalidation de gènes par recombinaison homologe. Dans les différentes expérimentations, une attention particulière sera portée sur la douleur des souris afin d'y remédier.

L'ensemble du projet nécessitera l'utilisation de 300 souris et 30 femelles gestantes par an.

702- Ce projet vise à étudier l'effet de composés biologiques (anticorps, enzymes) et d'effecteurs chimiques sur la modulation de la croissance pileuse in vivo.

Les pathologies liées au follicule pileux chez l'homme, tels que les différents types d'alopécies ou l'hirsutisme par exemple, ont des origines variées (hormonales, infectieuses, auto-immunes, ou médicamenteuses) et peu étudiées. Une meilleure connaissance du follicule pileux pourrait par ailleurs ouvrir des voies de recherche intéressantes pour améliorer la cicatrisation et la régénération cutanée, les cellules souche du follicule étant également activées au cours de la cicatrisation.

Compte-tenu de l'importance du rôle du follicule pileux dans certains désordres pathologiques, il est nécessaire d'étudier les voies de signalisation ainsi que le rôle de divers composés modulateurs du cycle pileux. Bien que le rôle de certains facteurs de croissance, des hormones stéroïdiennes, des interactions dermo-épidermiques et du système immunitaire fassent l'objet d'études, les facteurs modulant la division cellulaire des cellules de la matrice du follicule, et contrôlant le cycle folliculaire, restent peu connus. Les modèles in vitro permettant l'étude de l'effet de composés sur l'élongation de cheveux microdisséqués en culture existent, mais ils permettent seulement des observations morphométriques et non l'étude des voies de signalisation impliquées dans l'environnement cutané du follicule. La mise en œuvre d'études immunohistochimiques et de l'expression protéique de biopsies de peau entière contenant des follicules à différentes

phases du cycle restent nécessaires pour l'étude extensive des facteurs et voies de signalisation moléculaires gouvernant le cycle du follicule pileux, normal ou pathologique. L'utilisation d'un modèle souris est ainsi nécessaire pour l'étude des produits biologiques et/ou chimiques ciblant les protéines impliquées dans le développement du follicule pileux. Ce projet consiste en l'application topique de composés sur le dos de souris C57BL/6 préalablement épilées sous anesthésie afin de réduire la douleur, le stress, et faciliter l'application topique. Ce projet n'implique pas de techniques invasives mais deux points limites sont considérés comme critiques et nécessitant la mise à mort des animaux:

- 1) dans le cas où le poids des animaux viendrait à chuter de plus de 15% de leur poids initial,
- 2) dans le cas où l'application topique des composés testés entraînerait des rougeurs cutanées ou des démangeaisons/irritations.

Dans l'un ou l'autre de ces cas, les souris du groupe affecté seraient mises à mort afin de réaliser des prélèvements histologiques et sanguins pour analyse.

Dans le but de réduire au maximum le nombre de composés testés in vivo, ceux-ci auront été préalablement sélectionnés en fonction de leur activité antiproliférative in vitro. De plus, les expériences seront établies en fonction du groupe contrôle, de manière à utiliser les mêmes groupes contrôles pour plusieurs composés évitant ainsi de répéter des expériences nécessitant les mêmes groupes contrôle ce qui réalisera une économie d'environ 84 animaux pour les procédures 2 et 3. Ainsi, le projet nécessitera au maximum 714 animaux: pour mener à bien les 4 procédures au lieu de 798. L'inhibition ou l'accélération de la croissance pileuse sera étudiée par observation macroscopique et prises de vue, de manière indolore pour le rongeur, pendant la durée des procédures. Des études immunohistochimiques ainsi que des analyses de l'expression de certaines protéines seront réalisées à l'issue des procédures, sur des biopsies cutanées, des extraits protéiques de follicules pileux et/ou du sang prélevés suite à la mise à mort des animaux.

703- La réponse immédiate d'un hôte pour lutter contre une infection bactérienne est l'activation de l'immunité innée avec en première ligne de défense l'implication des cellules phagocytaires que sont les macrophages et les neutrophiles. L'infection la plus courante chez les oiseaux et la plus lourde de conséquences en aviculture est la colibacillose, causée par les bactéries *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC).

Cependant, la pathogénie et la réponse précoce de l'hôte aux APEC sont encore méconnues. Afin d'explorer l'immunité innée des oiseaux à médiation phagocytaire, le projet vise à étudier l'interaction des macrophages et des hétérophiles (équivalent des neutrophiles chez les oiseaux) avec les APEC. Cette interaction hôte-bactéries étudiée au niveau des cellules phagocytaires dans le cadre de la colibacillose aviaire permet d'analyser les premières phases de l'infection et de déterminer les facteurs importants dans son contrôle.

Les cellules phagocytaires sont purifiées à partir d'exsudats péritonéaux collectés sur six poulets âgés de 5 à 8 semaines, après euthanasie. Préalablement, ces cellules sont recrutées dans la cavité péritonéale des poulets en y injectant un polymère sucré (dextran) 16 heures ou 40 heures, respectivement pour les hétérophiles ou les macrophages, avant euthanasie et lavages péritonéaux (3 animaux d'une même lignée par préparation de population phagocytaire). Les préparations cellulaires issues des lavages péritonéaux sont réalisées tout au long du projet (estimées à une par trimestre) et nécessitent un total de 120 animaux. Les cellules récoltées sont ensuite mises en culture in vitro avec les *Escherichia coli* à pouvoir pathogène plus ou moins fort afin d'étudier les interactions hôte-bactéries.

Le remplacement des phagocytes péritonéaux par des cellules sanguines n'est pas envisageable car les phagocytes circulants dans le sang des oiseaux sont en trop faible quantité pour collecter un nombre suffisant de cellules. De plus, le remplacement par des lignées cellulaires immortalisées n'est pas envisageable car il n'y en a pas de disponible pour les hétérophiles. La procédure d'obtention des cellules respecte la règle du raffinement dans la mesure où ces cellules sont recrutées par injection intrapéritonéale d'un polymère neutre qui ne provoque pas d'inflammation chez l'animal. La réduction du nombre d'animaux a été respectée de façon à obtenir un nombre suffisant de cellules pour les tests in vitro.

Le niveau d'association des bactéries avec les cellules et la capacité à survivre à la phagocytose est ensuite étudié in vitro. Diverses souches bactériennes sont comparées pour déterminer leur pouvoir invasif. La stimulation des cellules phagocytaires consécutive au contact avec les bactéries est étudiée en mesurant l'évolution du niveau d'expression de récepteurs, de cytokines pro et anti-inflammatoires, de peptides antimicrobiens et en mesurant la réponse oxydative des cellules. Ces données nous permettront de mieux comprendre l'implication de la réponse immune innée médiée par les cellules phagocytaires des oiseaux dans la lutte contre une infection colibacillaire.

704- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client de BIOMEOSTASIS, qui développe un composé X (la dénomination du composé est sujette à accord de confidentialité) à visée commerciale permettant de réduire les facteurs de risques associés aux troubles métaboliques, tels que le pré-diabète et le surpoids. Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer les effets bénéfiques du composé X sur l'homéostasie glucidique et sur la prise alimentaire et le poids corporel chez un modèle nutritionnel de souris présentant un surpoids et un pré-diabète. Cette étude intègre également l'analyse de biomarqueurs plasmatiques liés à la régulation glycémique et au contrôle de la prise alimentaire. A terme, les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société cliente de commercialiser un composé améliorant chez l'homme les troubles métaboliques précités.

L'étude consistera en une phase initiale de 8 à 10 semaines durant laquelle un premier lot d'animaux sera soumis à une alimentation enrichie en graisse (HFD pour High-Fat Diet) de façon à induire un phénotype pré-diabétique, alors qu'un

second lot d'animaux recevra une alimentation standard (NC pour Normal Chow), permettant ainsi de contrôler et d'attester des désordres métaboliques attendus chez les animaux HFD. Afin de suivre la progression des phénotypes au cours de cette première phase, la prise alimentaire et le poids corporel des animaux seront mesurés de façon bihebdomadaire. De plus, après 7 semaines de régime, un prélèvement sanguin sera réalisé sur chaque animal pour dosage de la glycémie et des taux d'HbA1c à jeun (3h en phase diurne) afin de vérifier le phénotype pré-diabétique des animaux HFD en comparaison des animaux NC. S'il s'avérait que le phénotype pré-diabétique ne soit pas assez marqué, une période de régime de 2 semaines supplémentaires pourra être appliquée avant de passer à la phase de traitement proprement dite. Dans ce cas, un second prélèvement sanguin sera réalisé sur chaque animal après 9 semaines de régime pour dosage des mêmes biomarqueurs évalués après 7 semaines de régime.

A l'issue de cette première phase, les deux lots d'animaux conserveront le même régime alimentaire (HFD et NC) et recevront une administration per os journalière du composé X (groupes traités) ou du véhicule (groupes Contrôles) pendant 6 semaines. Pendant cette phase, le poids corporel et la prise alimentaire des animaux seront mesurés de façon bihebdomadaire et la glycémie à jeun (3h en phase diurne) mesurée deux fois (après 2 et 4 semaines de traitement). A l'issue de la phase de traitement, l'ensemble des animaux seront mis à jeun durant 14h à partir du soir et chaque groupe sera divisé en deux sous-groupes, l'un recevant un « repas test » après lequel un prélèvement sanguin terminal sera pratiqué avant euthanasie pour mesures des taux plasmatiques de biomarqueurs « postprandiaux », alors que l'autre sous-groupe sera soumis à un test de tolérance orale au glucose (OGTT) pendant lequel plusieurs prélèvements sanguins seront pratiqués afin de mesurer la glycémie et l'insulinémie.

Le projet est basé sur des procédures expérimentales peu invasives puisque limitées à des mesures de prise alimentaire et de poids corporel, des prises de sang, une administration orale journalière du composé X (ou de son véhicule) ainsi qu'une administration orale unique de glucose (OGTT en fin d'expérimentation). Le niveau de souffrance qui en résulte est par conséquent léger.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution in vitro n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude des effets d'un traitement chronique sur la régulation de l'homéostasie glucidique et sur le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Le modèle animal envisagé est un modèle souris (souche C57Bl/6) soumis à une alimentation enrichie en graisse, modèle qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'étude. Ce modèle expérimental est particulièrement maîtrisé chez BIOMEOSTASIS car développé avec succès à de nombreuses reprises dans des contextes expérimentaux similaires.

Un total de 80 souris C57Bl/6 sera utilisé : 48 souris soumises à un régime enrichi en graisse (modèle de pré-diabète) et 32 souris sous alimentation standard. A l'issue de la phase de 8 à 10 semaines de mise en place du modèle (procédure expérimentale 1), et compte-tenu du fait que sous régime enrichi en graisse une proportion d'environ 30% des animaux présentent une résistance à l'induction du surpoids et du pré-diabète, 32 souris pré-diabétiques seront sélectionnées sur la base des résultats obtenus en termes de poids corporel, de glycémie et de taux d'HbA1c, et seront utilisées pour la suite de l'étude (procédures expérimentales 2 à 4). Les 16 souris présentant une résistance à la mise en place du phénotype seront euthanasiées à la fin de la procédure expérimentale 1.

705- Le système nerveux central des mammifères est constitué de deux types cellulaires, les neurones et les cellules gliales. A la différence des neurones, les cellules gliales sont électriquement silencieuses et un rôle de soutien leur est classiquement attribué. Cependant, des travaux récents suggèrent une participation des astrocytes, un sous-type de cellules gliales, au traitement de l'information par le cerveau. Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les interactions entre astrocytes et neurones ainsi que l'importance de ces interactions en condition physiologique et pathologique sont encore mal connus. Notre objectif est d'étudier les mécanismes des interactions entre astrocytes et neurones et l'impact de ces interactions sur l'activité neuronale en condition physiologique et pathologique.

Les astrocytes occupent 50% du volume de la substance grise corticale des mammifères. Ils sont à l'interface des neurones, en particulier des synapses, et des vaisseaux sanguins. En condition physiologique, les astrocytes contrôlent la concentration extracellulaire de glutamate, de potassium, les apports métaboliques aux neurones en relation avec l'activité, ainsi que toutes fonctions essentielles à la survie des neurones. Ils moduleraient aussi l'excitabilité des réseaux de neurones. En condition pathologique, en particulier dans la maladie d'Alzheimer, l'activité des astrocytes change mais la signification de ces changements reste inconnue. Notre objectif est d'une part d'analyser le rôle des astrocytes en condition physiologique et d'autre part d'évaluer le rôle des astrocytes dans les processus dégénératifs observés dans la maladie d'Alzheimer. Pour ce faire seul un modèle animal est actuellement disponible.

Les astrocytes sont des cellules inexcitables et nous enregistrons leur activité grâce à différents types d'imagerie en culture cellulaire et sur tissu vivant. L'approche optogénétique est privilégiée pour l'enregistrement et l'activation des astrocytes qui sont électriquement silencieux. L'expression des indicateurs de seconds messagers (calcium, sodium, cAMP, etc.) codés génétiquement est contrôlée par injection intracérébrale virale et utilisation de souris transgéniques. Les mêmes méthodes seront utilisées pour l'expression de protéines photoactivables utilisées pour activer les astrocytes. Les méthodes électrophysiologiques sont utilisées pour enregistrement de l'activité neuronale extracellulaire et intracellulaire.

Notre modèle animal est la souris. Nous avons choisi cette espèce afin d'être en mesure d'utiliser les animaux transgéniques d'intérêt. Nous travaillons sur des tranches de cerveau fraîchement isolées. Nous effectuons aussi des marquages immuno-histologiques à partir de tissu fixé. Il n'existe pas de modèle de substitution nous permettant d'étudier

le rôle des astrocytes en condition physiologique ou pathologique. Cependant toutes nos expériences sont réalisées en conformité avec la législation en vigueur et toutes les précautions sont prises afin d'éviter d'imposer aux animaux des souffrances inutiles. Le nombre de souris utilisées est d'environ 1000 sur cinq ans pour 40 semaines d'expérimentation par an.

706- L'équipe "Canaux Ioniques et Douleur" étudie les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la perception douloureuse, et en particulier le rôle de protéines membranaires, les canaux ioniques, en développant leur pharmacologie. A partir d'une bibliothèque de venins et toxines animales, notre équipe a déjà identifié plusieurs toxines (d'anémone de mer, de mygale et de serpents) inhibant spécifiquement les canaux ioniques de type ASIC. Leur injection in vivo a permis de montrer que les canaux ASIC étaient impliqués dans la détection de la douleur ainsi que dans la transmission du message jusqu'au cerveau

Le but de ce projet est de tester les effets in vivo de nouvelles toxines naturelles (ou peptides dérivés) avec le double objectif de mieux comprendre le rôle des canaux ioniques dans la douleur, mais aussi de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques pour le développement de nouveaux analgésiques. Notre équipe est déjà à l'origine de 3 brevets déposés par le CNRS proposant des toxines animales comme nouveaux analgésiques potentiels alternatifs à l'usage de la morphine. Nous nous proposons de tester quatre composés d'intérêt, obtenus après criblage fonctionnel d'une bibliothèque de venins, dans les cinq ans couverts par ce projet. Les effets de chaque composé seront étudiés sur les courants ioniques et l'excitabilité des neurones de rongeurs en culture primaire (électrophysiologie, procédure 1) puis in vivo après injection chez le rat ou la souris en réalisant des tests comportementaux de douleur et de motricité (procédures 2 à 9). Les effets observés seront comparés aux effets de la morphine, analgésique de référence. Les mécanismes seront étudiés en utilisant des inhibiteurs spécifiques de certains canaux ioniques ou récepteurs membranaires et des souris génétiquement modifiées dont l'expression d'un gène d'intérêt a été invalidé (« knock-out »). En l'absence de souris « knock-out » déjà disponibles, ainsi que chez le rat, une l'inhibition de l'expression d'un gène d'intérêt sera réalisée par injections de siRNA, des petit ARN interférents spécifiques (« knock-down »).

L'objectif de Réduction a été pris en compte en réduisant le nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre d'animaux total (5820 souris et 680 rats pour 5 ans) annoncé ici correspond au nombre maximal nécessaire. Il sera réduit chaque fois que possible, et toute expérience rendue inutile par des résultats précédents obtenus par nous ou d'autres groupes (veille bibliographique mondiale permanente) ne sera pas conduite. L'objectif de Raffinement a été pris en compte en choisissant des tests comportementaux complémentaires mettant en jeu différentes modalités douloureuses (thermique chimique ou mécanique, aigüe ou inflammatoire...) ou motrices (motricité intégrée ou force musculaire). Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance. Ces études précliniques chez l'animal restent nécessaires au dépôt de brevets et à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux analgésiques.

707- Chaque année, 10000 nouveaux cas de cancer de la vessie sont diagnostiqués en France. Malgré l'augmentation croissante du taux d'incidence, le taux de mortalité est loin d'être à la baisse avec 4500 décès annuels enregistrés. Ceci est la conséquence de l'absence de nouveaux traitements ciblés et proposés aux patients en dehors de la chimiothérapie et de la radiothérapie conventionnelle. Il est donc urgent de développer de nouvelles thérapies innovantes et ciblées pour améliorer la qualité de vie des patients atteints de cancer de la vessie. Pour ce faire, nous souhaitons développer un modèle orthotopique, c'est à dire situé au niveau de son tissu d'origine, de cancer de la vessie qui permet de mimer la pathologie humaine, dans lequel le système immunitaire est intact et les interactions tumeur-stroma (tissu en grande partie conjonctif) sont conservées. Ce modèle sera utilisé pour tester l'efficacité de molécules modulant le développement de vaisseaux sanguins tumoraux (angiogenèse tumorale), le système immunitaire et/ou le pouvoir invasif et/ou prolifératif des cellules tumorales. Les molécules auront été préalablement sélectionnées à partir de modèles expérimentaux réalisés sur des cellules en culture, ou qui ont démontré une activité dans d'autres types de cancer, chez la souris ou chez l'homme. En l'absence de méthodes de substitution ce projet sera effectué sur des souris, considérant la forte homologie biologique avec l'humain, et la facilité de leur manipulation. En se basant sur les données de la littérature concernant les modèles orthotopiques vésicaux et en conformité avec la règle des 3R, une première expérience d'optimisation sera réalisée pour la mise au point du modèle et permettre de réaliser un calcul d'effectif afin de réduire le nombre de souris nécessaire par groupe. Une estimation totale de 500 à 600 souris est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

708- La qualité du profil en acides aminés de la protéine alimentaire influence l'efficacité d'utilisation de la protéine par les animaux (volailles, porcs, vaches laitières). Il a été établi que l'apport complémentaire d'acides aminés limitants dans des rations permettait aux animaux de mieux utiliser la protéine et ainsi réduire les rejets azotés. Chez les ruminants (vaches laitières), le processus de digestion dans le rumen conduit à un remaniement important de la nature des nutriments absorbés au regard de la composition de l'aliment. Ainsi une quantité importante des acides aminés de l'aliment est dégradée lors de la digestion microbienne ruminale qui en synthétisent d'autres. Les acides aminés (d'origine microbienne ruminale et ceux ayant échappés à la dégradation ruminale) sont tous absorbés au niveau de l'intestin grêle. Les rations de vaches laitières conduisent à des apports déficitaires en lysine, méthionine ainsi qu'en histidine et leucine absorbables. Aussi des procédés technologiques consistent à protéger certains acides aminés de cette dégradation par les microbes du

rumen (protection physique, encapsulation...) pour augmenter leurs quantités absorbées. Le développement de ces procédés est bien avancé pour la méthionine mais l'est beaucoup moins pour les autres acides aminés. Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité des différentes formes de protection d'un acide aminé chez la vache laitière. Le principe d'évaluation du taux de protection repose sur le fait que la quantité d'acide aminé absorbée est corrélée à la concentration sanguine de cet acide aminé. Pour cela quatre vaches laitières seront utilisées pendant 12 périodes de 4 jours (une période par semaine). L'essai sera précédé de 3 semaines d'adaptation à l'alimentation, au logement et à la traite. L'alimentation ne sera pas limitante car elle couvrira les besoins nutritionnels des animaux. Les 4 vaches seront logées en stabulation dans une même salle. Elles seront traitées deux fois par jour comme cela est pratiqué classiquement dans les élevages. Cependant, le protocole de traite sera un peu modifié pour minimiser la variabilité expérimentale et permettre que les vaches produisent pendant tout l'essai la même quantité de protéines du lait et donc d'acides aminés exportés dans les protéines du lait. Ces animaux feront l'objet d'un suivi biquotidien. Un test *in vitro* ne peut remplacer l'estimation *in vivo* de la biodisponibilité de l'acide aminé protégé cependant nous proposons un schéma expérimental puissant qui permet réduire le nombre d'animaux expérimentaux à 4 en accord avec la règle des 3R.

#### 709- 1- Objectif scientifique du projet

Ce projet porte sur les effets de la lactation sur la composition des os et des dents. Il permettra de mieux caractériser l'impact du sevrage sur les tissus minéralisés et apportera un jeu de données pouvant dans un second temps servir de références permettant de déterminer l'âge au sevrage de n'importe quel mammifère à partir de l'étude de ses os ou de ses dents.

#### 2- Retombées attendues

Ces échantillons permettront d'étudier les modifications de composition des tissus minéralisés liées au sevrage lactique d'une part et à la lactation d'autre part. Les résultats permettront également de définir les marqueurs du sevrage repérables dans les tissus minéralisés mammaliens non-murins,

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

Pour réaliser cette étude, nous utiliserons le modèle souris dont les connaissances précises sur le développement osseux et dentaire nous permettront d'interpréter les résultats dans un cadre parfaitement établi. Pour chaque individu, les os longs et les dents seront prélevées trois semaines après le sevrage, permettant de multiplier les mesures sur différents tissus et donc de réduire le nombre d'individus nécessaires à l'étude et d'affiner les résultats en éliminant la variation interindividuelle.

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

Au total, ce projet repose sur l'étude de quatorze souris: deux mères et douze souris de deux portées différentes.

710- Le cancer de la prostate est un des cancers les plus répandus chez l'homme dans les populations occidentales et constitue une des principales causes de mortalité par cancer chez l'homme.

Au cours de la progression tumorale, une cellule normale acquiert progressivement des capacités de prolifération non contrôlée, d'invasion et de dissémination métastatique. Ces processus sont responsables des décès liés au cancer de la prostate.

Il n'existe à ce jour aucun marqueur biologique validé de progression tumorale dans le cadre du cancer de la prostate, c'est-à-dire aucun moyen de prévoir comment va évoluer la tumeur jusqu'à une forme létale. L'amélioration de la survie des patients atteints du cancer de la prostate requiert de nouvelles approches pronostiques, afin d'anticiper la progression tumorale. De nouvelles stratégies thérapeutiques (parallèles ou substitutives au traitement anti-androgénique) sont également indispensables pour prendre en charge la maladie à potentiel évolutif et/ou métastatique. Ces outils complémentaires de pronostic, permettant une meilleure définition des différentes catégories de tumeurs, pourront guider les cliniciens dans leurs démarches thérapeutiques afin d'adapter les traitements aux patients.

L'application de thérapies personnalisées, secteur en plein essor, constitue en effet le futur enjeu de santé publique et son succès repose sur la découverte de nouveaux marqueurs moléculaires.

Nous avons identifié miR-135a, un microARN dont l'expression est soumise à régulation par les androgènes, via le récepteur aux androgènes AR, acteur clé du développement tumoral prostatique. Suppresseur de tumeur, miR-135a régule l'expression de gènes cibles impliqués dans les processus cellulaires favorisant la formation des métastases (adhésion, migration, invasion).

L'objectif de la présente demande est donc de valider *in vivo* les mécanismes étudiés et validés précédemment *in vitro*. Des souris SCID mâles xénotreffées à l'aide de cellules tumorales prostatiques humaines PC-3 génétiquement modifiées - surexprimant de façon stable le microARN d'intérêt miR-135a - seront utilisées pour cette demande.

Compte-tenu de la littérature et de l'expérience en la matière de laboratoires collaborateurs, le modèle souris immunodéprimées et xénotreffées sur les flancs nous apparaît pertinent pour l'objectif recherché. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum (20 souris), sans compromettre les objectifs du projet et permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Les gestes expérimentaux proposés sont d'ailleurs tous d'une classe de gravité légère et sont bien maîtrisés.

A ce propos, des points limites prédictifs d'un échec de la maîtrise du geste ont été parfaitement définis, afin d'éviter toute souffrance de l'animal. Si ces points limites sont atteints, ils constitueront un motif d'interruption de l'expérimentation et cela conduira à la mise à mort immédiate par du personnel formé. Les points limites de l'expérimentation démontrant une souffrance potentielle des animaux seront : une perte conséquente de poids corporel (20% en une semaine), toute modification comportementale suspecte (prostration, perte de motricité), toute apparition d'ulcération au niveau de la tumeur ou l'atteinte du volume tumoral acceptable maximal.

711- 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 que le taux de guérison est 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 des produits d'immunothérapie spécifique du VHB. Un produit d'immunothérapie basé sur un vecteur viral non-réplicatif a déjà été sélectionné pour un développement clinique chez l'homme. En parallèle et pour optimiser l'efficacité de ce produit, nous allons étudier dans des études pré-cliniques exploratoires le bénéfice d'associer ce produit à un autre produit spécifique du VHB et vectorisé par un vecteur viral différent. Ce type d'approche appelé « prime/boost hétérologue » pourrait augmenter et/ou modifier la qualité de la réponse induite et ainsi optimiser l'efficacité obtenue.

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 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 maximum 180 animaux.

712- 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 que le taux de guérison est 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 des produits d'immunothérapie spécifique du VHB. Un produit d'immunothérapie basé sur un vecteur viral non-réplicatif a déjà été sélectionné pour un développement clinique chez l'homme. En parallèle nous avons produit un autre produit spécifique du VHB et vectorisé par un vecteur viral différent. Les propriétés immunogéniques de ce dernier doivent être étudiées dans des études pré-cliniques afin d'optimiser la dose, la voie et le schéma d'administration. Ce deuxième vecteur pourra être utilisé seul dans certaines populations de patients ou dans une approche de type « prime/boost hétérologue » afin d'optimiser l'efficacité du produit principal chez certains patients.

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 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 de souris utilisées 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 maximum 456 souris.

### 713- 1- Objectif scientifique du projet

Malgré les avancées importantes de nos connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régissent le développement et la progression tumorale, et le nombre croissant de thérapies ciblées en développement, le traitement de la majorité des cancers reste problématique particulièrement lorsqu'ils deviennent métastatiques. La grande variabilité des tumeurs, rend difficile la prise en charge thérapeutique justifiant l'urgence du développement des approches de médecine personnalisée. Ce projet a pour objectif de développer des modèles tumoraux représentatifs de la clinique, associés à la collecte d'informations clinico-pathologiques (genre et âge, localisation de la tumeur, bilan d'extension, diagnostic, traitements, ...) et biologiques (histologie, analyses moléculaires extensives) de la tumeur initiale.

### 2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Ces modèles expérimentaux seront obtenus par xéno greffe de tumeurs humaines sur souris immunodéficiente. La collecte du matériel biologique nécessaire, se fera en collaboration avec des services de chirurgie, de clinique, et d'anatomopathologie dans le respect de la réglementation en vigueur à ce jour (consentement éclairé, sérologies, anonymat). Il est prévu d'établir une cinquantaine de modèles expérimentaux sur une durée de 5 ans. Par ailleurs des essais d'humanisation du microenvironnement tumoral, par co-injection de cellules du système immunitaire ou du stroma, seront réalisés afin de favoriser la prise de greffe et réduire le nombre d'animaux greffés.

Une fois la caractérisation biologique effectuée, la prédictibilité des modèles *in vivo* sera évaluée via des études pharmacologiques avec des molécules de référence (monothérapies et combinaisons), comparaison des résultats obtenus avec les données de patients au travers du suivi clinique. Enfin, les modèles pourront être utilisés pour tester de nouvelles molécules, identifier de nouvelles cibles ou marqueurs de réponse aux traitements.

### 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 la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe modérée. Nombre total d'animaux inclus dans ce projet 4000 souris sur 5 ans.

714- Le projet proposé vise à démontrer le rôle de la réponse aux glucocorticoïdes dans le développement de tumeurs mammaires triple négatives et enrichies en marqueurs de cellules souches. Dans un second temps les effets métaboliques de cette réponse seront analysés tant d'un point de vue systémique par analyse des fluides biologiques (sang et urine) des animaux qu'au niveau des tumeurs formées via l'analyse des « empreintes » métaboliques qui leur sont associées. Ces analyses métaboliques auront pour but de décrire les remodelages métaboliques s'opérant au sein des cellules souches cancéreuses *in vivo*, remodelage capable d'induire une plasticité métabolique spécifique à ces cellules et contrôlée par la réponse aux glucocorticoïdes.

Ces expériences devraient confirmer les résultats obtenus *in vitro* et associer la réponse aux glucocorticoïdes à un élément clef nécessaire au développement des cellules souches cancéreuses. Ces analyses pourraient s'avérer essentielles pour les stratégies thérapeutiques utilisées aujourd'hui. Des activateurs de la réponse aux glucocorticoïdes entrent dans les protocoles de traitement actuels afin de limiter la réponse inflammatoire associée aux chimiothérapies avec donc un risque potentiel de favoriser le développement de cellules souches cancéreuses.

L'utilisation de modèles animaux (souris immunodéprimées) se justifie par les différences de conditions nutritives *in vitro* et *in vivo*. *In vitro* nous avons pu montrer que la réponse aux glucocorticoïdes permettait aux cellules souches cancéreuses mammaires d'acquiescer une plasticité métabolique capable de limiter le stress métabolique associé à l'oncogène en présence de conditions les plus physiologiques possibles. Cependant, le renouvellement nutritif au niveau du liquide interstitiel *in vivo* est très difficilement reproductible *in vitro* et donc ces expériences ont besoin d'être confirmées dans un environnement nutritif complexe uniquement présent chez l'animal. Le nombre d'animaux utilisés sera le plus limité possible et les expériences conduites sous un mode pyramidale. Un très faible nombre d'animaux seront utilisés dans un premier temps afin de démontrer la capacité de nos cellules mammaires à former une tumeur. A partir des conditions positives, un nombre d'animaux statistiquement relevant sera ensuite utilisé pour l'analyse phénotypique des tumeurs. Le stress imposé à l'animal sera toujours le plus limité possible avec un suivi quotidien en phase d'approche du point limite. Les prélèvements sur l'animal seront effectués uniquement après avoir limité les conditions expérimentales assurant la formation d'une tumeur.

Au maximum, le nombre d'animaux ne dépassera pas 200 souris. Ce nombre ne sera atteint qu'en cas de validation de l'étude préliminaire utilisant 50 souris et si toutes les conditions expérimentales conduisent à la formation d'une tumeur.

715- Le virus FHCC, virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo, est capable d'infecter une large gamme d'hôtes mammifères dans la nature mais jusqu'ici provoque seulement des maladies chez les humains. En raison de l'absence de traitement spécifique antiviral et vaccinal, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de développement.

L'étude du virus FHCC et des stratégies thérapeutiques implique l'utilisation de modèles animaux adaptés, c'est-à-dire capable de développer une maladie aiguë, se rapprochant étroitement des caractéristiques de la maladie humaine. Ces

modèles doivent permettre l'étude de la pathologie liée à l'infection par le virus FHCC, ainsi que l'analyse des mécanismes immunopathologiques liées à l'infection.

Les modèles animaux pour l'étude du virus FHCC étaient jusqu'à présent limité à l'infection par voie intracrânienne ou intrapéritonéale de souris ou de rats avec les virus FHCC.

Les expériences utiliseront des souris adultes transgéniques déficientes pour la réponse interféron, le développement d'une maladie aigüe avec une issue fatale ayant été rapporté sur ces animaux.

Pour chaque protocole, des groupes de souris pondérés pour permettre une interprétation statistique de l'étude seront réalisés.

La validation d'antiviraux sur des modèles in-vitro permet de restreindre le nombre de molécules à tester. L'utilisation du modèle murin permettra la validation de traitements plus spécifiques de l'infection par le virus FHCC.

Une attention particulière est portée sur le choix des réactifs, la prise en compte de la douleur durant l'expérience et le confort quotidien des animaux.

Le projet repose sur trois protocoles expérimentaux et nécessite l'emploi au plus de 1315 souris. L'obtention d'une protection induite par l'utilisation d'une des molécules testées avec le premier protocole étant nécessaire pour la réalisation des deux suivants.

716- L'utilisation des acides aminés de synthèse en élevage porcin permet de réduire l'apport en protéines dans l'aliment tout en préservant la croissance des animaux et, par conséquent, de réduire les rejets d'azote dans l'environnement. Cette réduction nécessite de bien connaître les besoins en acides aminés essentiels afin d'éviter des carences nutritionnelles. Depuis quelques années, notre laboratoire a mené un programme de recherche pour déterminer le besoin en valine chez le porcelet (poids inférieur à 25 kg). Ce besoin est maintenant déterminé et admis pour le porcelet, mais aucune information n'existe quant au besoin en valine chez les porcs plus lourds. La consommation de protéines est la plus importante chez les porcs en phases croissance et finition (25 à 115 kg de poids vif). La connaissance sur le besoin en valine est un préalable important pour réduire davantage les apports protéiques et, en conséquence, réduire les excréments azotés.

Ce projet a pour but de proposer des recommandations nutritionnelles en valine et des effets de sa carence chez le porc à 2 stades de croissance (à 45 et 90 kg de poids vif). Quatre expériences de 5 semaines chacune seront réalisées avec 60 porcs par expérience. Pendant les expériences, les porcs seront logés en cases individuelles dans une même salle, permettant des contacts visuels, auditifs, et olfactifs avec des congénères. Les animaux seront pesés hebdomadairement. Les animaux recevront des aliments avec des apports nutritionnels différents pour déterminer le besoin en valine et certains animaux vont recevoir des aliments carencés en valine. Si les animaux répondent à cette carence comme les porcelets, nous anticipons qu'ils réduiront leur consommation volontaire d'aliment de 15 à 20%. En conséquence la croissance sera également réduite. A la fin de l'expérience, les animaux de 90 kg seront abattus dans des conditions commerciales, alors que les animaux de 45 kg resteront dans la ferme expérimentale et seront nourris avec des aliments standards (ce qui leur permettra de rétablir leur consommation et leur croissance) puis abattus dans des conditions commerciales.

Ce protocole respecte les règles des 3R appliqués à l'expérimentation animale pour plusieurs raisons. La première est que nous visons à réduire le nombre d'animaux à utiliser dans chaque essai jusqu'à un minimum possible pour définir le besoin en valine chez le porc. De plus, le choix de chercher une réponse au niveau de l'animal individuel nous permet de limiter le nombre d'animaux expérimentaux. Les réponses recherchées (ingestion d'aliment, croissance) sont des caractéristiques pertinentes sur un plan de « pratique du terrain » et qui peuvent être obtenues de façon non-invasive. Nous avons déjà réalisé une méta-analyse sur la réponse du porc aux apports en valine. La grande majorité des études réalisées est faite sur des jeunes animaux (< 65 j ; 25 kg) et les 2 études faites sur des animaux plus lourds n'ont pas pu montrer une réponse à l'apport en valine. Or, en théorie (basée sur la modélisation), le besoin en valine augmente avec l'âge et le poids des animaux. Le projet proposé aura pour objectif de tester cette hypothèse.

717- La production de volailles de chair représente une activité économique non négligeable en France. Le niveau d'alimentation des poules reproductrices a des répercussions sur l'engraissement et sur les performances de reproduction, ce qui entraîne des pertes économiques. Pour limiter ces conséquences défavorables sur la fertilité, les poules reproductrices de type chair sont soumises à une restriction alimentaire. Cependant, cette pratique peut conduire à des modifications de comportements et a fait l'objet d'un examen par le Conseil de l'Europe visant à définir une réglementation européenne autour du bien-être des poules reproductrices. Chez les rongeurs, il a été montré que le tissu adipeux produit des molécules appelées adipocytokines, capables de contrôler à la fois la mobilisation des réserves adipeuses, l'ingéré alimentaire et les fonctions de reproduction.

Le but de notre projet est de déterminer chez la poule reproductrice si ces adipocytokines sont des indicateurs de la composition corporelle et de l'engraissement qui pourraient être mis en relation avec la fertilité et permettre de limiter la restriction alimentaire. Pour cela, nous étudierons les effets d'une alimentation rationnée ou ad libitum couplée ou non à l'ajout d'un mélange d'acides gras n-3 /vitamine E, composants connus pour augmenter la production d'adipocytokines chez les rongeurs, sur différents paramètres: le poids, la composition corporelle, les performances de reproduction (taux de ponte, fertilité, mortalité embryonnaire, taux d'éclosion), les performances de la descendance notamment la viabilité et le pourcentage de lésions cutanées (évaluation du bien-être). Plus précisément, jusqu'à 3 sem. les animaux (n=320) seront nourris ad libitum, puis ensuite ils seront divisés en deux groupes jusqu'à 10 sem. (l'un sera rationné à 15%, taux effectué

jusqu'ici dans les élevages, l'autre continuera à être nourris ad libitum), à 10 sem. ces deux groupes seront divisés à nouveau en deux (l'un sera supplémenté en acide gras n-3 (3% d'huile de lin) + Vitamine E (80 UI/kg) et l'autre pas). Au total, à 10 sem., nous aurons 8 répétitions\*10 poules\*4 lots expérimentaux. La période d'essai sera de 3 sem. à 40 sem. A 25 et 30 semaines d'âge, l'ensemble des poules sera inséminé artificiellement (double IA) avec du sperme issu de coqs de même type génétique. Pour la collecte de semence, 65 coqs (environ 2 coqs pour 10 poules) seront élevés séparés des femelles en cage individuelle. Après les IA, les œufs seront collectés pendant 3 semaines consécutives avec mise en incubation régulière après 7 jours de collecte (environ 390 œufs/lot restreint avec un taux de ponte moyen d'environ 80% et environ 270 œufs/lot ad libitum avec un taux de ponte d'environ 55% à chaque mise en incubation, les taux de ponte sont évalués selon Heck et al., 2004). La fertilité, la mortalité embryonnaire (précoce, tardive) et le taux d'éclosion seront contrôlés au couvoir. Après éclosion, les poussins (un total d'environ 6350) issus de chaque groupe de poules (environ 4800 poussins pour les deux lots restreints et 3240 poussins pour les deux lots ad libitum) seront élevés collectivement (8 parquets/lot) jusqu'à 10 jours d'âge, afin d'évaluer l'impact du traitement alimentaire des mères sur les performances des poussins (mortalité, croissance et consommation d'aliment).

En plus des mesures de paramètres zootechniques et de reproduction, des prises de sang (2ml/prise) seront réalisées à 3, 10, 17, 25, 30 et 40 semaines d'âge afin de mesurer les concentrations plasmatiques des adipocytokines. A la maturité sexuelle (20 semaines) et après le pic de ponte (40 semaines), 10 poules/lot seront abattues pour les analyses de la composition de la carcasse, du foie, du gras abdominal et de la grappe ovarienne (étude expressionnelle des adipocytokines et de leur récepteur). Ces données nous permettront de mettre en relation les paramètres concernant les adipocytokines avec les paramètres d'ingéré alimentaire, de composition corporelle (poids, % de lipides) et de fertilité. Ce travail devrait permettre de repérer des animaux à risque d'infertilité, de mieux adapter les conduites alimentaires, voire de sélectionner des animaux moins sensibles à la mobilisation des réserves corporelles, tout en maintenant un bon niveau de production et sans dégrader la fertilité.

718- Lors de la réparation tissulaire, une perturbation de l'équilibre entre régénération et cicatrisation peut conduire à une complète restauration du tissu ou à son remplacement par de la fibrose. Cet engagement dans une voie régénérative ou cicatricielle est déterminé grâce aux interactions de différents partenaires (cellules souches, immunitaires, stromales).

Nous avons identifié de nouvelles cellules souches dans le muscle squelettique humain. In vitro elles se différencient en adipocytes ou en myo-fibroblastes et participent à la formation de cellules musculaires (myotubes).

Nous souhaitons maintenant évaluer ces potentiels in vivo en injectant ces cellules dans un modèle animal de fibrose musculaire.

Les applications seront une meilleure compréhension des troubles musculaires impliquant l'accumulation de gras intramusculaire et de fibrose, ainsi qu'une évaluation détaillée de l'impact du lignage intramusculaire fibro-adipogénique sur les muscles sains et dystrophiques. Cela montrera si l'expression de ce lignage a un effet délétère ou de protection sur la régénération musculaire.

Notre projet donnera des bases pour optimiser la (les) sous-population(s) de cellules dérivées du muscle le plus approprié pour la thérapie cellulaire et pour évaluer les conséquences cellulaires de l'injection de myoblastes. Cela fournira de nouveaux paramètres pour améliorer les thérapies des myopathies, y compris les thérapies cellulaires et pharmacologiques.

719- Le projet XEMOFOLY a pour but le développement d'un modèle de lymphome humain xéno greffé en intrafémoral chez des souris femelles NOD SCID GAMMA (NSG). En effet, le lymphome est une pathologie cancéreuse dont la fréquence a énormément augmenté ces 40 dernières années. Il se traduit par le développement de tumeurs au sein des ganglions (amygdales...) mais également au sein de la moelle osseuse.

L'aboutissement de ce projet conduirait à la création d'un nouveau modèle animal pour l'étude de cette pathologie et pour le test de différentes molécules destinées à son traitement.

Les animaux seront tout d'abord pré-conditionnés afin de leur induire une hypoplasie médullaire. Deux types de pré-conditionnement seront testés et comparés : un traitement chimique avec de l'hydroxyurée (procédure expérimentale 1) et un traitement par radiations ionisantes avec des doses allant de 0,5 Gray à 3,5 Gray (procédure expérimentale 2). Un lot de souris n'ayant reçu aucun traitement sera également réalisé afin d'avoir un groupe d'animaux contrôle (procédure expérimentale n°3). Basé sur l'optimisation du pré-conditionnement, trois lignées de lymphome humain seront implantées chez des souris au niveau intrafémoral avec des quantités de cellules variant de 105 à 107 cellules/animal (procédure expérimentale n°4). Une fois les conditions optimales de xéno greffes déterminées pour chaque lignée, du Matrigel (procédure expérimentale n°5) ou des cellules stromales humaines (procédure expérimentale n°6) seront ajoutés afin d'améliorer la prise de greffe. L'utilisation conjointe de Matrigel et de cellules stromales sera également testée afin d'obtenir une croissance tumorale optimale (procédure expérimentale n°7). Ces conditions optimales de pré-conditionnement et de xéno greffe seront finalement utilisées pour l'implantation intrafémorale de prélèvements de lymphome provenant de patients atteints par cette pathologie (procédure expérimentale n°8). Le choix de la souris NSG repose sur le fait que ce type de xéno greffe requiert une souche immunodéficiente dépourvue de lymphocytes T, B et NK. Le respect de la règle des 3R se traduit par l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques afin d'éviter toute souffrance aux

animaux. De plus, l'évaluation régulière du score de grimace des animaux et le suivi de leur poids et de leur comportement permettra d'avoir un contrôle sur leur état de santé.

Le développement du lymphome est étroitement lié à la présence d'un microenvironnement tumoral adapté (cellules stromales de différents types, facteurs de croissance, ...). Ce microenvironnement n'est pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux vivants est indispensable pour le développement de ce type de tumeur.

Ce projet nécessite également de tester un grand nombre de paramètres différents (le pré-conditionnement, le type et la quantité de cellules à implanter, l'utilisation ou non de Matrigel, la co-implantation de cellules stromales humaines et la greffe d'échantillons issus de lymphome de patient). A cela s'ajoute tous les lots de souris « contrôle » indispensables à la réalisation de cette étude (souris sans aucun traitement ou avec injection de milieu seul ou traitées par un pré-conditionnement seul etc...). Il faut également prendre en compte les 80 souris qui seront commandées auprès du fournisseur pour l'élevage. Ainsi, le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 900 souris.

720- Dans le cadre de l'élevage bovin, tous les progrès de la sélection animale de 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 têt (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. GenEpi 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 la qualité du lait), de génotypage (données génétiques par indexation) et d'épigénotypage dans des conditions d'élevage classiquement mises en œuvre dans les unités expérimentales INRA. 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 complémentations différentes préconisées actuellement dans les élevages. L'originalité de ce projet réside dans la comparaison des résultats obtenus dans plusieurs unités expérimentales. Un premier essai est en cours. La présente demande concerne l'essai mené sur 20 vaches. Un troisième essai sera conduit en 2014. Chaque essai fait l'objet d'une demande d'expérimentation animale.

721- Il est désormais clair que de nouveaux neurones continuent à être produits dans le cerveau des mammifères adultes. Aujourd'hui, de nombreux travaux indiquent l'existence d'un lien fonctionnel entre certains apprentissages et formes de mémoire et la neurogenèse adulte. Cependant, la production de nouveaux neurones dans l'hippocampe diminue fortement avec l'âge et pourrait participer au déclin cognitif qui accompagne le vieillissement normal. Il a été montré qu'il persiste dans l'hippocampe du cerveau âgé, une population de pro géniteurs neuraux endogènes capables de proliférer et de donner naissance à de nouveaux neurones granulaires. Ceci suggère qu'il serait pertinent d'examiner si la neurogenèse hippocampique peut être stimulée afin de compenser la diminution de l'activité neurogénique associée au vieillissement cérébral physiologique et/ou pathologique. Dans ce contexte, les recherches que nous souhaitons conduire auraient deux objectifs :

- 1) Développer et valider une stratégie originale ayant pour but de stimuler la maturation des cellules en division dans l'hippocampe chez la souris de laboratoire, saine et jeune
- 2) Evaluer les liens entre nouveaux neurones et troubles cognitifs chez la souris transgénique modèle de la maladie d'Alzheimer au cours de l'évolution de la pathologie.

La mise en place de cet outil pourrait ouvrir de nombreuses perspectives pour stimuler la neurogenèse et proposer de nouvelles pistes pour le traitement de certaines pathologies dans le cerveau âgé ou malade.

Pour ce faire, sur l'ensemble du projet, nous utiliserons 120 souris consanguines et 320 souris transgéniques –rétro croisées sur le même fond génétique-, ce qui permettra de réduire la variabilité interindividuelle et donc de minimiser les effectifs par lot.

Nous bénéficions depuis 2012 d'agrément ministériels pour l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés

722- L'exposition chimio-sensorielle (stimulation olfactive, gustative et trigéminal) de jeunes mammifères *in utero* (dans le liquide amniotique) et/ou au cours de la lactation modifie leur attraction ultérieure face à ces composants. Il a ainsi été démontré que des nouveau-nés, humains ou murins (souris et rat), exposés à un odorant initialement neutre pendant la période foetale et/ou postnatale, montrent par la suite une préférence ou une consommation plus importante pour ce composé.

La question est à présent de comprendre si un environnement chimio-sensoriel plus ou moins varié pendant la période foetale ou pendant la période de lactation peut moduler des traits de personnalité, tels que la réactivité émotionnelle face à

la nouveauté. En d'autres termes, dans quelle mesure un environnement sensoriel précoce varié va diminuer la néophobie sensorielle dans des contextes aussi divers que son alimentation ou son activité sociale.

Cette question est suggérée par des résultats récents chez l'enfant humain, pour lequel l'exposition précoce à la variété aromatique (dans le lait ou au cours de la diversification alimentaire) se traduit par une augmentation de la tolérance à la nouveauté sensorielle.

Nous avons choisi de réaliser ce travail sur un modèle murin. Cela permettra une approche expérimentale rigoureuse 1) de l'exposition à une variété sensorielle contrôlée au cours de la période fœtale ou de lactation et 2) des effets comportementaux au cours du développement.

Dans ce projet, les souris (environ 200 individus) ne subiront pas de procédure expérimentale douloureuse. Ils seront donc soit réintégrés dans notre élevage pour former de nouveaux couples (notre équipe travaillant sur les nouveau-nés mammifères), soit euthanasiés au terme de l'étude. Ils pourront également éventuellement être utilisés dans d'autres projets au sein de notre équipe ou de notre unité.

723- Lors du développement de nouveaux médicaments et/ou sondes d'imagerie, il est nécessaire d'étudier la façon dont la molécule d'intérêt se distribue et est éliminée de l'organisme. Pour cela, si aucune donnée de littérature n'existe, nous vérifierons d'abord sur culture cellulaire que le composé étudié n'exerce pas de toxicité. Nous procéderons ensuite au radiomarquage de la molécule (ajout d'un isotope radioactif) puis au contrôle in vitro de la préservation de l'activité biologique de la molécule suite à ce marquage. Ce n'est qu'ensuite que nous administrerons la molécule radiomarkée par voie intraveineuse à des souris afin de suivre celle-ci dans le temps par imagerie nucléaire.

L'espèce de choix pour l'étude de la biodistribution de ces composés sera la souris saine ou porteuse de tumeur (en particulier dans le cas où le composé étudié est censé viser préférentiellement une cible tumorale).

Pour chaque étude (estimées à 6 études par an, 3 réalisées sur souris saines et 3 sur souris porteuses de tumeurs), nous formerons 4 groupes d'animaux (n=8 animaux par groupe, n=32 souris par étude) recevant l'isotope radioactif libre, ou la molécule d'intérêt à 3 doses distinctes. Sur 5 ans, nous estimons donc le nombre d'animaux à n=480 souris saines et n=480 souris porteuses de tumeurs.

724- La toxoplasmose congénitale pose un problème économique majeur à l'industrie agroalimentaire car elle est la première cause de mortalité fœtale et d'avortements spontanés chez les ovins (plus d'1 million de cas par an en Europe). L'infection primaire par le parasite entraîne une réponse immunitaire conférant une protection permanente contre une réinfection et contre une transmission mère-enfant. Ainsi il devrait être possible de développer un vaccin inocuitaire et efficace contre la toxoplasmose acquise et congénitale. Un vaccin vivant atténué est commercialisé dans certains pays pour un usage vétérinaire. Cependant une possibilité existe d'avoir une réversion de ces parasites vers une forme pathogénique, le rendant inutilisable pour une vaccination humaine. De plus, ce type de vaccin est cher, nécessite un stockage particulier, cause des effets secondaires non désirés, est difficile à manipuler et à une durée de demi-vie courte. Actuellement, il n'existe donc aucun moyen de lutte efficace contre la toxoplasmose congénitale ovine. Dans le but de dépasser ces problèmes, les recherches actuelles se tournent vers les vaccins sous-unitaires. Ce projet est concentré sur la conception d'un vaccin mucosal nouvelle génération permettant la délivrance d'antigènes capable de cibler les muqueuses et leurs cellules immunitaires. L'étude de faisabilité chez la souris a démontré que le vaccin induisait une réponse immunitaire humorale et cellulaire forte, ainsi qu'une protection contre l'infection par *Toxoplasma gondii*. Il pourrait donc réduire ou prévenir la formation de kystes dans les tissus, source de contamination pour la viande consommée par l'Homme. L'objectif de ce projet est de tester ce candidat vaccin synthétique efficace pour une application vétérinaire. Une première étape permettra la sélection d'une formulation vaccinale optimale pour des études cliniques chez la brebis (espèce cible) et une seconde d'éprouver ce candidat vaccin. Le projet sera réalisé en deux étapes qui nécessiteront un total de 120 brebis sur une période de 3 ans. Ce vaccin devrait diminuer le nombre de kystes musculaires et cérébraux et protéger les brebis gestantes contre l'avortement spontané si l'infection primaire par *Toxoplasma gondii* se produit durant la gestation (1,25 million de brebis par an en Europe avortent à cause de l'infection de ce parasite).

725- Les nonylphénols (NP) et les phtalates (en particulier le di-(2-éthylexyl)phtalate DEHP) figurent dans la liste des Substances Prioritaires dans le domaine de l'eau au titre de l'article R. 212-9 du code de l'environnement et en vu des Directives 200/60/CE et 2008/105/CE. Leur utilisation dans un grand panel de produits industriels et domestiques résulte en une large contamination environnementale persistante (eau potable, rivières, eaux pluviales et usées...). Il existe une large contamination par les NP et les phtalates de la plupart des individus des populations industrialisées. Ces deux molécules ont été détectées dans plus de 75% des échantillons d'urine chez des sujets adultes, toutefois, les conséquences de l'exposition à l'âge adulte (comparé à l'exposition au cours du développement) n'ont été que peu explorées. Nous posons l'hypothèse que les activités anti-androgéniques des NP et du DEHP interfèrent avec les effets centraux de la testostérone à l'âge adulte et nous rechercherons si leurs effets sont cumulables ou non à faibles doses chez la souris. En effet, cette espèce est un excellent modèle d'étude pour l'étude des effets des perturbateurs endocriniens. Le triste épisode du syndrome diethylstilbestrol humain a bien démontré la pertinence du modèle rongeur. De plus, les données sur les effets du BPA seul que nous avons accumulés dans ce modèle et la disponibilité de lignées de souris transgéniques qui

nous permettent de disséquer les mécanismes moléculaires des perturbateurs endocriniens sont autant d'arguments en faveur du choix de cette espèce.

Nous utiliserons environ 260 animaux souris afin de mesurer le comportement sexuel des animaux, les taux de testostérone circulants, le poids du tractus génital mâle et l'expression de différents marqueurs reflétant la régulation de l'axe reproducteur mâle, autant de mesures qui ne peuvent être remplacées par des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

726- La paratuberculose ou maladie de Johne est une entérite chronique des ruminants d'élevage. L'agent causal est *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* (Map). Cette pathologie a des conséquences majeures dans les élevages en particulier économiques (perte de production, réforme précoce, perte de valeur marchande). Les éleveurs sont de plus en plus sensibilisés et s'engagent dans des processus de certification fastidieux basés sur des diagnostics peu spécifiques. En effet Map possède de nombreux antigènes communs à des souches de mycobactéries de l'environnement. L'identification du lipopentapeptide (L5P) spécifique de la paroi de Map est une opportunité pour améliorer la spécificité. La preuve de concept pour l'utilisation du L5P en sérologie est établie. La réponse immune à médiation cellulaire précède physiologiquement la réponse immune à médiation humorale mesurée en sérologie. L'objectif de ce projet est d'étudier la capacité du L5P à induire une réponse cellulaire, ce qui en ferait un potentiel outil de diagnostic plus précoce de la pathologie. Pour cela le suivi d'animaux isolés d'un cheptel naturellement infecté est une réelle opportunité. En effet, dans le cadre du projet région centre Para3B nous suivons deux cheptels bovins infectés par Map. En parallèle des prophylaxies annuelles menées par un groupement régional, nous analysons la réponse cellulaire et humorale L5P dépendante. Au cours de ce suivi, nous identifierons les bovins présentant une réponse cellulaire sans réponse humorale et sans excrétion du bacille. Nous estimons donc que les animaux seront en phase précoce de la pathologie. Dès lors, 2 à 6 bovins (en fonction des cas cliniques) seront récupérés chez les éleveurs et entreront en expérimentation pour un suivi journalier de l'évolution de la pathologie. C'est une occasion rare et unique de suivre l'évolution de la réponse immune chez un animal en contact naturel avec Map afin de mieux comprendre cette pathologie animale d'impact important en santé vétérinaire.

727- L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique évolutive dans laquelle la pompe cardiaque ne peut assurer le débit cardiaque nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Elle constitue un enjeu majeur en termes de santé publique et c'est la pathologie cardiovasculaire qui présente le taux de croissance le plus rapide en raison du vieillissement de la population et d'une meilleure prise en charge de l'infarctus du myocarde. La stimulation du nerf vague, qui permet de moduler l'activité parasympathique pour rééquilibrer la balance sympathico-vagale, fait partie des approches novatrices potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

De manière générale, le projet de recherche en cours a pour but de démontrer, avant transposition à l'homme, les bénéfices de la stimulation vagale sur les paramètres structurels et fonctionnels d'insuffisance cardiaque, en aigu puis en chronique, sur un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque post-infarctus chez le gros animal.

Le projet d'expérimentation animale détaillé ici complète une étude en cours, avec pour objectif d'explorer et de valider des concepts innovants qui permettront d'optimiser le système de neurostimulation, ses fonctionnalités et ses performances, en proposant des avancées significatives sur la détection et l'exploitation des signaux physiologiques ainsi que sur les modalités de stimulation.

Pour cela, vingt moutons sains viendront compléter les populations d'animaux sains et insuffisants cardiaques actuellement suivies. Au cours d'une unique journée d'expérimentation, ils seront anesthésiés et appareillés pour une série de tests liés au matériel et aux modalités de stimulation et d'enregistrement, puis sacrifiés. Afin de réduire la souffrance des animaux, l'unique procédure expérimentale de chirurgie se fera après une prémédication et sous anesthésie générale. Les moutons recevront une injection de morphine en début de procédure et toutes les 4 heures. Enfin, des points-limites ont été établis.

728- L'insuffisance cardiaque est une pathologie grave avec de lourdes conséquences en termes de morbidité et de mortalité, et pour laquelle les thérapeutiques actuelles n'apportent qu'une réponse partielle et palliative. Par cette étude, nous souhaitons mettre au point une technique novatrice de création d'insuffisance cardiaque ischémique par voie endocoronaire chez le lapin et nous souhaitons étudier une alternative prometteuse parce que curative : la thérapie cellulaire. Nous ambitionnons d'étudier un total de 40 lapins, mâles, de race New Zealand. Les femelles sont écartées de notre recrutement afin d'éliminer un biais d'interprétation lié aux œstrogènes. Chaque animal présentera un tableau d'insuffisance cardiaque secondaire à l'embolisation de leur artère coronaire circonflexe par voie endo-vasculaire. Cette technique innovante, peu invasive et réalisée sous anesthésie générale, expose les animaux à des complications limitées et leur épargne une intervention chirurgicale. Ils seront ensuite surveillés sur une période de convalescence de 3 à 4 semaines, correspondant au délai de cicatrisation du myocarde et de remodelage du ventricule gauche. Au terme de cette période, chaque animal sera évalué de façon clinique, biologique et échographique. L'insuffisance cardiaque, ainsi que ses conséquences, seront alors évaluées et serviront de référence. Les animaux seront ensuite répartis en 4 groupes de 10 animaux. Il existera un groupe contrôle et trois groupes candidats à la thérapie cellulaire. Ces trois groupes seront destinés à étudier trois types de patch et de cellules différents. Les patchs seront appliqués par voie chirurgicale sur la zone infarctée sous anesthésie générale. La période de suivi sera alors de 6 mois. Tous les animaux feront l'objet d'une évaluation mensuelle clinique, biologique et radiologique. La surveillance de chaque animal par les techniciens animaliers et par les

vétérinaires, ainsi que les évaluations complémentaires, sont susceptibles d'être renforcées à titre individuel en cas de phénomène intercurrent ou de point-limite atteint. Au terme de cette période les animaux seront sacrifiés et feront l'objet d'une ultime évaluation.

729- Un prélèvement sanguin ou urinaire sera réalisé chez le *Macaca fascicularis* après administration aiguë ou sub-chronique de nos composés en association ou non de corticoïdes, ceci afin d'évaluer leur impact sur les marqueurs biologiques du remodelage osseux.

Les modèles cellulaires de prolifération ou de différenciation, ne permettent pas de réconcilier toutes les phases du processus de détérioration micro-architecturale du tissu osseux, entraînant une fragilité osseuse accrue. En effet, l'équilibre entre synthèse et résorption est très finement réglé, et tout déséquilibre du remodelage osseux conduit à des maladies osseuses graves (ostéopétrose, cancer des os ...).

Au delà des tests in vitro, un modèle physiopathologique in vivo de dosage des indicateurs biochimiques du remodelage squelettique est donc nécessaire.

En fonction du protocole, un traitement avec les composés à tester sera réalisé en absence ou en présence de corticoïdes. Le traitement pharmacologique sera aigu ou sub-chronique. Plusieurs paramètres seront évalués : suivi clinique des animaux, et dosage des biomarqueurs de la formation et de la résorption osseuse, notamment.

Une analyse en cross-over sera envisagée pour limiter le nombre d'animaux (entre 4 à 6 animaux) par phase expérimentale, et la réutilisation des animaux sera possible après une période de wash-out et en fonction des propriétés de l'élément d'essai.

730- Ce projet a comme but principal d'étudier si l'exposition à une récompense alternative peut avoir un effet positif sur l'addiction et plus particulièrement sur les risques persistant de rechute. Cette hypothèse de travail est basée sur des recherches récentes qui montrent que l'exposition à un milieu riche et stimulant est capable de diminuer le comportement de recherche de drogues chez les rongeurs et d'autres recherches qui montrent que si des rats doivent choisir entre le sucrose et la cocaïne ils choisissent en grande majorité le sucrose. Ici nous allons tester si, pendant une période de sevrage, des rats qui ont la possibilité de consommer des solutions sucrées ou de faire de l'exercice physique rechutent moins que des rats contrôles respectivement exposés à des solutions aqueuses ou à une roue d'activité bloquée.

Toutes les expériences auront 2 phases en commun et une 3ème phase qui changera en fonction de la mesure réalisée.

La phase 1 correspond à la chirurgie qui a pour but l'implantation d'un cathéter chronique dans la veine jugulaire des rats.

La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue dans des cages opérantes.

La phase 3 correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats auront accès à une récompense alternative (du sucrose) suivant une procédure de « 2-bottles choice » ou de tests opérants ou accès à une roue (running wheel) pour faire de l'exercice physique volontaire.

Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut uniquement être mené sur un animal vivant. Néanmoins nous avons pris en considération la règle de 3Rs pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Pour cela nous utilisons des méthodes expérimentales validées et reproductibles et des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettent des comparaisons multiple et de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Nous avons calculé que pour cette étude 224 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

731- Le thème de recherche développé par le laboratoire est centré sur l'étude des lésions cérébrales néonatales. Ces lésions, qui affectent les nouveau-nés à terme ou prématurés de façon fréquente (2 à 2,5 cas pour 1000 naissances), sont à l'origine de handicaps moteurs, de déficits cognitifs et/ou de problèmes d'ordre neuropsychiatrique. Ces lésions constituent la première cause de paralysie cérébrale dans les pays industrialisés.

Malgré d'importants progrès réalisés en réanimation pédiatrique, la prévalence de la paralysie cérébrale reste stable voire augmente depuis les années 1950. Les facteurs de risque sont la prématurité, les épisodes d'hypoxie-ischémie, l'exposition périnatale à des toxiques comme l'alcool ou les infections fœtales. Les patients atteints de paralysie cérébrale doivent être suivis médicalement durant toute leur vie. Outre les problèmes humains, familiaux et sociaux générés par ces pathologies, le coût de prise en charge est évalué à environ 850 000 euros par patient. En France, selon une expertise INSERM, 125 000 patients étaient atteints de paralysie cérébrale en 2004, et le nombre de patients atteints de déficits cognitifs était estimé à 4 ou 5 fois plus. En néonatalogie, les outils pronostiques et diagnostiques manquent à l'heure actuelle. Il s'avère nécessaire de mener des recherches sur les mécanismes des lésions cérébrales néonatales, de façon à développer des stratégies thérapeutiques de neuroprotection. Des recherches fondamentales et cliniques (initiées localement) ont amené à proposer l'utilisation de sulfate de magnésium dans les maternités. La recherche expérimentale du laboratoire est menée sur des modèles animaux murins porteurs de lésions cérébrales mimant les altérations décrites chez l'humain, avec pour objectif de transposer les stratégies thérapeutiques vers la pratique clinique.

Le programme de recherche est basé sur l'induction néonatale de lésions cérébrales chez la Souris par des approches simples ou combinées utilisant la chirurgie, l'hypoxie, des inactivations géniques et l'administration par voie périphérique ou centrale d'agents à effet neurotoxique. L'expérimentation sur l'animal est pratiquée chez la souris gestante, et/ou chez la souris à différents stades de développement (de la naissance à l'âge adulte). Les lésions cérébrales générées durant la période périnatale miment certains aspects des lésions observées en clinique, et ont été validées par des études préalables. Des études de caractérisation histologique, neurochimique ou comportementale sont réalisées chez les animaux lésés, traités ou non par des agents neuroprotecteurs. L'évaluation des animaux traités peut être faite jusqu'à l'âge adulte. La neuroprotection est évaluée par ces trois types d'approche, en utilisant des effectifs de souris compatibles avec un traitement statistique des résultats, comme cela est précisé plus loin. Pour l'ensemble des études, on peut estimer à 10 220 par an le nombre de souris impliquées (à titre de reproducteurs, entretien de lignées génétiquement modifiées, porteurs de lésions, traités par des agents potentiellement neuroprotecteurs, ainsi que tous les contrôles correspondants), pendant la durée du projet, soit 5 ans. Le nombre d'animaux est limité aux seules expériences considérées comme absolument indispensables. Les mères gestantes sont légèrement anesthésiées (isoflurane) lors des traitements et les souriceaux opérés sous anesthésie reçoivent un traitement antidouleur. Les souriceaux sont remis auprès de leur mère après intervention. Dans le cas de refus de maternage ou de souffrance avérée (vocalisations, agitation durable), les souriceaux sont euthanasiés.

La complexité du développement cérébral, la diversité des phénomènes délétères et leurs interactions conduisant à des lésions et des handicaps sont telles que l'expérimentation in vivo n'est pas substituable pour conclure à l'existence réelle, dans l'organisme entier, de mécanismes délétères ou à l'efficacité d'approches de protection dont l'existence ne peut être qu'au mieux suggérée par les approches réductionnistes. Ces dernières (cultures cellulaires, explants, études biochimiques) sont mises en œuvre en parallèle afin d'optimiser au maximum l'utilisation de ces animaux.

732- Nous avons initié la cryopréservation de lignées murines afin de se prémunir d'un éventuel accident sanitaire et pour conserver le patrimoine génétique des lignées hébergées au sein de la plateforme. Nous avons donc cryoconservé du sperme de certaines de nos lignées. Dans cette optique, nous envisageons de pouvoir revitaliser des lignées congelées. Actuellement nous ne maîtrisons pas en interne la technique de réimplantation dans l'infundibulum, acte chirurgical qui plus est. Une nouvelle technique a vu le jour aux USA, et commence à être développée par certaines animaleries en R&D ; à savoir la technique « NSET » (Non-Surgical Embryo Transfert) de réimplantation de blastocystes par voie naturelle. Cette technique rapide, et sans dommage pour la souris nécessite tout de même de cultiver des embryons jusqu'au stade blastocyste. Ayant l'expérience de la collecte du sperme ; nous avons donc pensé à développer une technique d'insémination artificielle. Nous allons donc dans un premier temps inséminer des femelles avec du sperme frais puis avec du sperme préalablement congelé. L'insémination artificielle permettra de réduire le nombre d'animaux par rapport aux techniques classiques de transfert d'embryons. Cette technique ne nécessite aucune anesthésie, aucune chirurgie, ni aucune surveillance post-opératoire.

Nous allons utiliser 2 souches classiques, et majoritairement présentes dans notre animalerie, la C57Bl/6 J et la MF1, afin de comparer les rendements et les taux de naissance. 290 animaux seront nécessaires pour mener à bien ce projet sur les 2 années.

733- En clinique, les lésions des nerfs périphériques sont fréquentes et la récupération fonctionnelle est souvent insuffisante. La démyélinisation est le résultat de lésions neuronales ou des cellules de la gaine de Schwann. Les lésions neuronales peuvent survenir dans les suites d'un traumatisme, ou peuvent être acquises du fait de lésions virales, de maladies autoimmunes, de troubles métaboliques ou de lésions par des agents toxiques. Jusqu'à présent, peu de traitements sont proposés chez l'Homme. Ils sont la plupart du temps basés sur l'administration d'anti-inflammatoires. Il a été montré que le lithium pouvait favoriser la remyélinisation sur un modèle de lésion du nerf facial. Le lithium est un inhibiteur de l'enzyme GSK 3 beta et intervient sur la voie de signalisation de la voie Wnt/. Dans une étude récente, il a été récemment montré que la vitamine D augmentait la myélinisation. La vitamine D est un groupe de séco-stéroïdes incluant la vitamine D2 ou ergocalciférol et la vitamine D3 ou cholécalférol. Le cholécalférol augmente chez le rat la myélinisation et la récupération fonctionnelle après lésion périphérique (modèle de section et autogreffe du nerf péroné). Aucune étude n'a été réalisée chez la souris et sur le nerf facial, nerf moteur qui contrôle la motricité de la face.

Le but du protocole proposé est d'évaluer à l'aide de méthodes quantitatives la récupération fonctionnelle de la motricité faciale et la récupération neuronale après de section-suture du nerf facial après traitement par la vitamine D3. La récupération fonctionnelle est analysée par une méthode vidéo en quantifiant le mouvement des vibrisses du côté lésé (score de 0 à 2) à différents stades post-lésionnels. La repousse axonale est appréciée en injectant un marqueur rétrograde, le fluorogold (FG), dans les vibrisses du côté sain et lésé et en comptant après contre coloration au neurotrace, les motoneurons marqués au niveau du noyau facial latéral à l'aide d'un microscope à fluorescence. La repousse neuronale et la remyélinisation sont étudiées sur le nerf facial après section-suture après traitement à différents temps post-lésionnels en microscopie optique et électronique (mesure du G ratio).

Ce projet va nécessiter l'utilisation de 240 souris répartis en 3 groupes expérimentaux :

- L'étude comportementale comprendra une étude vidéo de la récupération de la motilité des vibrisses tous les trois jours de J0 à J30; à J2mois et J3 mois (n=60).

- L'étude morphologique de la récupération de la repousse neuronale à l'aide du Fluorogold sera faite à J14, J21 et J30 et J60 (n=120).

- La remyélinisation du nerf facial sera étudiée à J1 mois en MO et ME (n=60).

Les souris feront l'objet de soins visant à optimiser leur santé, de traitement analgésique et de soins pré et post-opératoires adaptés, et seront hébergés dans des conditions favorisant leur récupération post-opératoire. Les animaux bénéficieront d'un suivi individualisé effectué par du personnel qualifié.

Notre but à terme est de proposer une étude multicentrique chez l'Homme confirmant l'efficacité de la vitamine D3 dans les lésions des nerfs périphériques.

734- Le nombre d'allergies augmente dans les pays industrialisés. Cette augmentation est pour partie liée à d'éventuels contaminants présents dans les aliments. L'alimentation des tout-petits peut contenir des contaminants dans les laits infantiles ou résidus de pesticides dans les légumes utilisés pour les plats « maison » si les légumes sont issus de l'agriculture conventionnelle. Or, les jeunes enfants sont particulièrement vulnérables car leur système immunitaire est immature. Pourtant, l'impact de ces contaminants sur le développement des allergies n'est pas connu.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer si l'exposition précoce à ces contaminants peut augmenter le risque de développer une allergie et de manifester des réactions allergiques digestives une fois l'allergie développée. Ce projet est soutenu par des financements publics obtenus après un avis favorable d'experts scientifiques dans le cadre d'un appel à projet.

Dès que cela est possible, les études seront menées in vitro afin de respecter les exigences de remplacement. Les études qui seront menées sur l'animal sont uniquement celles ne pouvant pas être remplacées. Certains aspects du projet ne peuvent pas être étudiés avec des outils in vitro. En effet, l'allergie étant une maladie complexe faisant intervenir plusieurs systèmes physiologiques, il est nécessaire de comprendre la réaction d'un organisme entier pour évaluer les effets de contaminants.

Le modèle animal choisi sera la souris car ce sont les animaux de laboratoire les plus utilisés pour étudier le développement des allergies et pour lequel il y a le plus de données dans la littérature.

L'étude expérimentale est une étude originale, réalisée pour la première fois. Cette étude n'est donc pas la répétition d'études identiques antérieures. Le nombre d'animaux choisis correspond au nombre minimum d'animaux par lot (5 à 8 souris par lot) permettant d'avoir une pertinence statistique lors des analyses ultérieures, soit 150 souris environ pour les 3 ans de projet (15-17 lots envisagés). Compte tenu des objectifs de l'étude et des contraintes expérimentales, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R.

735- Le pain est un aliment complexe de consommation courante qui est cuit à forte température. Cette étape de chauffage est responsable de la texture, de l'arôme et de l'appétit à la conservation du pain. Néanmoins, durant la cuisson, une réaction connue sous le nom de la réaction de Maillard a lieu. Cette réaction est génératrice de composés à effets controversés pour la santé du consommateur. Plusieurs études ont été menées sur les molécules créées suite à cette réaction. Certaines ont été trouvées potentiellement toxiques, voire cancérigènes. Par contre, d'autres molécules sont soupçonnées d'avoir des effets bénéfiques, surtout pour l'équilibre des bactéries intestinales. Ces bactéries jouent un rôle indispensable pour la santé. Elles contribuent, entre autres, à la digestion, à l'assimilation des nutriments mais aussi à la protection contre plusieurs infections.

Notre objectif est d'étudier l'effet des produits de la réaction de Maillard du pain sur l'équilibre des bactéries de l'intestin et leurs conséquences sur l'effet protecteur de ces bactéries. Bien que des études aient été menées sur des bactéries provenant de matières fécales, il est impossible de simuler fidèlement en laboratoire la complexité des interactions entre les bactéries et le tube digestif. Il est donc nécessaire de mener ces études sur un modèle animal pouvant donner des réponses extrapolables à l'être humain. Ces réponses seront particulièrement importantes pour aider les patients souffrant d'inflammations chroniques de l'intestin à adapter leurs habitudes alimentaires afin de limiter les risques de malnutrition.

Cette étude expérimentale est complémentaire à des études réalisées auparavant. Elle ne consiste pas en une répétition identique puisqu'elle fait intervenir plusieurs nouveaux contrôles et paramètres. Le modèle animal choisi sera le rat car c'est un modèle reconnu pour sa pertinence pour la simulation de l'Homme. Les différents groupes seront constitués de 10 rats permettant d'avoir une significativité statistique lors des analyses qui suivent, soit un total de 140 animaux. Par conséquent, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R.

736- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les éventuels effets antifibrotiques d'une nouvelle molécule candidat-médicament sur la fibrose pulmonaire induite chez la souris par l'administration de bléomycine.

La fibrose pulmonaire s'avère être l'étape ultime, le plus souvent fatale, observée chez des patients atteints d'un certain nombre de pathologies pulmonaires inflammatoires ou suite à une exposition à un agent fibrosant (silice, fibres d'amiante, radiations ionisantes, bléomycine utilisée dans les protocoles de chimiothérapies, ...). Après avoir constaté chez l'homme l'apparition d'une fibrose pulmonaire suite à l'administration de bléomycine, un modèle animal a été développé pour étudier le processus de développement de la fibrose pulmonaire. En effet, une unique administration de bléomycine chez l'animal permet d'obtenir un dépôt de collagène dans les poumons après 2 semaines.

Au cours de chaque étude, les animaux (en général 10 par groupe) sont anesthésiés pour administrer la bléomycine ou son véhicule par voie intranasale. Les animaux ayant reçu la bléomycine sont traités avec le candidat-médicament testé à 3 doses différentes, avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée ou éventuellement avec un produit antifibrotique de référence (en général un total de 6 groupes par étude, soit un nombre prévisionnel maximum de 1200 animaux sur 5 ans).

Deux semaines après l'administration de la bléomycine, les animaux sont anesthésiés et différents prélèvements sont réalisés: le liquide de lavage bronchoalvéolaire et les poumons qui permettent en outre d'évaluer la composante inflammatoire et le dépôt de collagène qui caractérisent la fibrose pulmonaire.

Ce projet est réalisé sur la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur la fibrose pulmonaire. A ce jour, la souris est l'une des espèces qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

737- Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable chez l'homme d'hépatite aiguë en moyenne plus grave que l'hépatite A. Il s'agit d'un virus zoonotique pouvant être transmis de l'animal à l'homme par la voie alimentaire en cas d'ingestion de produits contaminés crus ou peu cuits. Le porc domestique est un réservoir très important du virus et la contamination tardive de celui-ci (peu de temps avant son abattage) ou de manière prolongée (portage chronique) constitue un risque important de persistance du virus au niveau du foie et donc d'introduction de foies contaminés dans la chaîne alimentaire. Des travaux récents décrivent des dynamiques d'infection très diverses selon les élevages conditionnés par la conduite d'élevage mais aussi potentiellement par les co-infections intercurrentes. Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est un virus très répandu chez le porc et à l'origine d'une immunodépression. Plusieurs publications rapportent des isollements simultanés VHE/SDRP à partir de prélèvements de terrain. Cette co-infection pourrait expliquer la variabilité observée en termes de durée d'excrétion du VHE, voire une certaine chronicité comme décrit chez l'Homme dans un contexte de traitement immunosuppresseur ou d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

L'objectif du projet est donc d'évaluer expérimentalement l'impact d'une co-infection SDRP sur la durée d'excrétion du VHE chez le porc (N=40) et son potentiel de transmission à des porcs sentinelles (c'est-à-dire un échantillonnage d'animaux servant à assurer le suivi sanitaire d'une population animale donnée) sensibles au travers d'expériences de transmission en population co-infectée SDRP. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux, en particulier le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes.

738- Ce projet répond à une préoccupation environnementale et à une volonté de préservation de la biodiversité en région Centre. D'une part, il a pour objectif de développer la production de cervidés en voie de disparition en faisant porter des embryons de ces espèces par l'espèce commune élaphe. D'autre part, ce projet cherche à connaître les conséquences de l'hybridation observée en milieu naturel entre espèces de cervidés élaphe-autochtone et si ka-espèce invasive, conduisant potentiellement à une pollution génétique des populations d'origine. A ces fins, nous étudierons la relation mère-jeune afin de comprendre dans quelle mesure sa qualité influe sur la survie des jeunes à la naissance mais également sur le choix du partenaire sexuel à l'âge adulte.

Sur l'ensemble du projet, nous utiliserons 80 femelles gestantes. Elles seront réparties en 4 groupes, à savoir des femelles élaphe porteuses d'embryons de type élaphe, de type hybride élaphe x sika (insémination avec du sperme de sika) ou de type sika (fécondation in vitro et transfert embryonnaire interspécifique) et des femelles sika porteuses d'embryons sika. Dans chacun de ces 4 groupes, nous observerons la relation mère-jeune dans les premiers jours qui suivent la naissance, ainsi que les taux plasmatiques de différentes hormones au cours de la gestation et de la parturition.

Nous chercherons également à mettre au point une méthode d'induction du comportement maternel chez 10 femelles élaphe non gestantes dans l'objectif de leur faire adopter des faons sikas. Enfin, nous évaluerons l'influence de la mère (sika ou élaphe) sur les choix sexuels des jeunes devenus adultes.

739- Un rôle important dans la genèse de l'obésité est joué par des hormones produites par des cellules présentes au niveau du système digestif ayant pour fonction le contrôle de la sensation de "faim" et de la motilité Gastro-intestinale. La modulation de la motilité gastrique pour traiter l'obésité, par des techniques endoscopiques, pourrait avoir un impact majeur sur la prise en charge du patient souffrant d'obésité morbide

Le but du projet GAMMA est de tester 2 modalités de modulation de la motilité gastrique :

1. L'interférence sur le pacemaker naturel de l'estomac utilisant des dispositifs "vibratoires" pouvant être placés de manière mini invasive au niveau de la paroi gastrique. Le rationnel de cette approche repose sur les expériences publiées concernant la stimulation électrique.
2. La rigidification de l'estomac par introduction de dispositifs spécifiques dans un tunnel créé dans la paroi gastrique à travers une technique d'endoscopie interventionnelle.

Remplacement: Pour tester l'hypothèse que la modulation de la motilité gastrique par stimulus mécanique soit efficace dans la réduction de la production de ghréline et de la prise alimentaire, le recours à l'animal est nécessaire. Le rat (rat Zucker, déficient en récepteur de la leptine et le rat Obesity Prone) et le porc sont les modèles de choix, car ils sont omnivores et partagent le même set hormonal régissant la prise alimentaire.

Réduction: ce projet sera décliné en 4 phases ou Working Packages (WP).

1) WPI (Rat) Il n'y a pas de données dans la littérature sur l'effet de la vibration sur la motilité gastrique permettant un calcul de l'échantillon a priori. Sur la base des études effectuées sur la stimulation électrique, et prenant comme endpoint la réduction de l'hormone de la faim "ghréline" un collectif de 56 Zucker rats et 56 Obesity Prone rats (total = 112 rats) seront inclus et divisés en 7 groupes de 8 animaux, (5 différentes stimulations, un groupe sham et un groupe contrôle opéré.

2) WP2 (Rat) Similairement, il n'y pas de données dans la littérature pour calculer un échantillon a priori. 48 Obesity Prone rats seront inclus et divisés en 6 groupes.

3) WP3 (WP 1 sur Cochon) L'utilisation du modèle porcin se justifie car son anatomie viscérale est très proche de celle de l'homme permettant d'utiliser les mêmes techniques de chirurgie et/ou d'endoscopie et les mêmes instruments d'usage courants chez l'homme.

Dans le WP3, 3 dispositifs développés dans notre institut seront testés. Une approche statistique pour réduire au minimum les sujets expérimentaux est décrite dans la section dédiée.

4) WP4 (WP2 sur Cochon) Nous devons tester 3 différents agents injectables et 2 dispositifs implantables pour déterminer 1) la faisabilité technique; 2) la durée de l'implant; 3) l'efficacité sur la réduction de la prise alimentaire. Une approche statistique pour réduire au minimum les sujets expérimentaux est décrite dans la section dédiée.

Raffinement: les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des anti-douleurs et des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

740- L'enjeu de notre étude est d'identifier le mécanisme cellulaire qui sous-tend la perméabilité vasculaire aux agents de contraste à base de fer dans les tumeurs cérébrales. Nos études préliminaires in vivo ont montré qu'il existe un mécanisme de macropinocytose dans les cellules endothéliales des vaisseaux présents dans les tumeurs et nous avons émis l'hypothèse que c'est ce mécanisme qui est responsable de la perméabilité vasculaire dans les tumeurs cérébrales. Nous souhaitons confirmer cette hypothèse en utilisant l'amiloride, inhibiteur de la macropinocytose.

L'amiloride est un médicament couramment utilisé chez l'homme pour traiter l'hypertension.

L'étude que nous souhaitons mener ici vise à déterminer in vivo par IRM si cette drogue a bien un effet sur la perméabilité vasculaire. Etant donné que nous cherchons à identifier des mécanismes cellulaires de perméabilité vasculaire qui sont induits par la tumeur, il n'est pas possible de remplacer ces modèles d'études in vivo par des modélisations informatiques ou par des études sur des cellules en culture. A ce jour, nos données préliminaires ont été obtenues chez le rat, c'est donc cet animal que nous allons utiliser.

Nous avons conçu cette étude de façon à limiter le nombre d'animaux. Dans un premier temps nous allons faire une expérience pilote pour tester le mode d'administration de l'amiloride. Des rats porteurs d'une tumeur (n=12) recevront 3 administrations différentes d'amiloride : injection intraveineuse en aigu, administration chronique dans l'eau de boisson pendant 24h et 48h, La perméabilité vasculaire sera évaluée après chaque administration d'amiloride par une méthode d'imagerie non invasive (l'IRM). Pour réduire au maximum le nombre d'animaux, ce sont les mêmes rats qui recevront les 3 administrations successives d'amiloride.

Dans un second temps, si l'expérience préliminaire a montré un effet de l'amiloride sur la perméabilité vasculaire dans les tumeurs, nous choisirons l'administration d'amiloride qui impacte le plus la perméabilité pour évaluer l'effet sur 3 types de tumeurs. A chaque fois nous utiliserons 6 animaux qui seront traités avec l'amiloride et 6 animaux non traités (36 rats au total). Les animaux seront euthanasiés à la fin de la session IRM, sauf si le point limite était atteint avant.

Cette demande d'autorisation porte donc sur un projet impliquant un total de 48 animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

741- Le nouveau concept intitulé « Quilamine » s'inscrit dans le développement de nouveaux agents anticancéreux. Les « Quilamines » sont des molécules constituées d'un chélateur du fer associé à un vecteur polyamine. La partie chélateur est destinée à priver la cellule en fer et ainsi à en inhiber sa prolifération. La partie polyamine va permettre de cibler préférentiellement les cellules tumorales.

Un criblage in vitro des différentes Quilamines synthétisées, a permis de sélectionner HQ1-44, la molécule la plus efficace. L'effet antiprolifératif de HQ1-44, observé dans la gamme de concentration micromolaire et son absence de cytotoxicité pour des concentrations inférieures à 100µM ont été détectés sur différentes lignées cellulaires tumorales d'origine humaine. La Quilamine HQ1-44 s'est avérée particulièrement active sur les cellules humaines issues d'adénocarcinome du colon HCT-116, ce qui a orienté notre étude préclinique vers le cancer colorectal. Parmi les traitements les plus couramment utilisés pour ce type de cancer, l'oxaliplatine présente une grande toxicité et induit de nombreux effets secondaires. L'objectif de ce projet est de montrer que la Quilamine HQ1-44 est au moins aussi efficace que l'oxaliplatine et pourrait être utilisée en remplacement ou pour diminuer sa dose active.

Dans cette phase de développement préclinique des Quilamines, le modèle murin constitue une étape incontournable, en l'absence de méthode alternative reconnue pour évaluer l'efficacité antitumorale systémique d'une molécule chez l'animal. Les souris immunodéprimées (nude) sont des souris femelles de 6 semaines (poids 20-25g), sexe couramment utilisés pour de telles études pour minimiser les agressions entre animaux. Nous avons apporté la preuve du concept par la démonstration de l'efficacité antitumorale chez l'animal de la Quilamine HQ1-44 sans toxicité sur les cellules non tumorales. Nous souhaitons poursuivre l'étude de l'efficacité antitumorale de la Quilamine HQ1-44 en la comparant à celle de l'oxaliplatine. Cette nouvelle étude préclinique requière l'utilisation de souris xénotreffées par les cellules HCT116, comme modèle. Ce projet prévoit deux étapes :

- Une comparaison de l'efficacité antitumorale de la Quilamine HQ1-44 à celle de l'oxaliplatine seul.
- Une étude de l'efficacité antitumorale d'un traitement HQ1-44/oxaliplatine combiné.

60 souris xénotreffées seront réparties en 5 lots de 7 à 10 souris par condition. Ce nombre d'animaux permettra d'obtenir des groupes de taille de tumeur homogène et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. En effet, il est greffé plus d'animaux que nécessaire afin d'obtenir des groupes homogènes au niveau de la croissance tumorale avant le début du traitement, les expériences précédentes nous ayant montré une grande variabilité de prise tumorale selon les souris. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour prévenir de toute souffrance éventuelle et mis à mort en cas d'atteinte des points limites. La masse des animaux et la taille des tumeurs seront mesurées trois fois par semaine.

742- L'hépatite est une maladie du foie, qui lorsqu'elle devient chronique favorise le développement de la cirrhose et du cancer du foie. Il est donc important de travailler pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette maladie pour envisager de nouveaux traitements. L'équipe travaille sur ce problème et en particulier sur la régulation et le rôle de cytokines qui sont des molécules de dialogue importantes entre les cellules et le système de défense de l'organisme. Nous avons obtenu des résultats sur la cytokine IL-33 à partir de l'étude d'échantillons humains dans un premier temps et en exploitant plusieurs modèles expérimentaux d'hépatite murine dans un 2ème temps. Ces résultats indiquent

- un rôle protecteur de cette cytokine IL-33 dans le développement et le contrôle de l'hépatite
- un lien direct entre la voie de mort induite par les agents pathogènes et la production d'interleukine 33 dans les hépatocytes des foies de souris malades

Pour améliorer notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort des hépatocytes qui donne l'hépatite et comprendre comment l'IL-33 est protectrice, il faut mener des études in vitro au moyen de cultures primaires d'hépatocytes murins. Ces cellules nous permettront d'étudier (i) les facteurs d'induction de la mort des hépatocytes, (iii) les mécanismes moléculaires survenant lors de la mort de ces cellules, (ii) le lien entre la mort des cellules et l'expression d'IL-33, (iv) le rôle protecteur de l'IL-33. L'intérêt d'exploiter des cultures primaires d'hépatocytes murins est notoire car nous disposons des animaux déficients pour les principaux gènes d'intérêt pour notre recherche, tels que l'IL-33, son récepteur, des gènes clés de la voie de mort. Ceci renforce la nécessité de développer nos études sur le modèle souris plutôt que d'autres espèces ou même humain.

Concrètement, des cultures primaires seront réalisées à partir de 5 animaux différents et le cas échéant à partir d'animaux OGM pour chaque condition d'étude : addition de facteurs inducteurs de la mort/survie des hépatocytes en présence ou en absence de divers inhibiteurs (en incluant différentes doses et cinétiques, ainsi que l'utilisation de virus hépatotrope murin MHV3). Pour l'obtention des cellules à partir du foie des animaux, ceux-ci seront endormis au moyen d'un anesthésique (barbiturique) afin d'empêcher toute douleur associée à l'opération chirurgicale de la pose d'un cathéter sur la veine cave du foie et de celle de l'ablation finale du foie. Les animaux (300 maximum) seront ensuite immédiatement mis à mort par section de la colonne vertébrale à l'aide de ciseaux. L'ensemble de la procédure sera réalisé dans l'esprit des 3R, avec la Réduction du nombre d'animaux à la mise en place des expériences requises, et le Raffinement de la procédure pour limiter au maximum la douleur et le stress des animaux et exploiter totalement le matériel cellulaire obtenu. Pour ce qui est du Remplacement, il a été envisagé mais n'est pas adapté pour l'obtention de résultats fiables transférables. En effet, l'alternative consistant à utiliser des lignées d'hépatocytes n'est pas adaptée du fait du statut transformé de ces cellules.

743- Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées une prestation de service qui consiste en l'évaluation de l'effet thérapeutiques de drogues pharmacologiques sur un modèle murin de tumeur cérébrale agressive - glioblastome - un contexte pathologique en échec thérapeutique.

Les tumeurs utilisent une batterie de mécanismes pour leur progression (prolifération cellulaire, néo-angiogenèse, échappement immunitaire, accélération du métabolisme tumoral...) ce qui rend nécessaire l'utilisation de modèles intégrés pour l'évaluation des propriétés thérapeutiques d'une drogue.

Notre prestation de service permettra aux clients d'évaluer l'effet de composés dans des conditions expérimentales strictes ou le nombre d'animaux et de groupes expérimentaux seront optimisés et un suivi fin des points limites sera réalisé afin de limiter au maximum la souffrance des animaux. Le nombre d'animaux utilisés dépendra des demandes des clients; nous l'estimons à 480 animaux f an (10 demandes d'expérimentations à 48 animaux).

744- Le paludisme est une des maladies parasitaires les plus répandues dans le monde et est toujours un problème majeur de santé publique. En 2009. 225 millions d'épisodes palustres cliniques ont été recensés dans le monde et environ 700 000

individus ont succombé à l'infection. Quatre espèces de Plasmodium infectent l'homme: Plasmodium falciparum, vivax, ovale et malariae, et c'est l'infection par P. falciparum qui est à l'origine de la majorité des décès dus au paludisme.

Le cycle de développement de Plasmodium se déroule chez deux hôtes successifs : un moustique et un hôte mammifère. Chez ce dernier, le parasite se développe d'abord dans le foie (stade hépatique) puis dans les globules rouges (stade érythrocytaire). L'étude des espèces de plasmodium infectant l'homme est aujourd'hui limitée à des expériences in vitro, à des infections chez certains singes (expériences coûteuses, faisabilité réduite, expertise requise) ou à l'étude du stade érythrocytaire du parasite dans des souris humanisées pour les globules rouges.

L'objectif du travail présent est de développer de nouveaux outils pour l'étude du paludisme in vivo. Il repose sur l'obtention de souris humanisées pour le foie et les globules rouges, permettant ainsi d'étudier le développement des espèces P. falciparum, P. vivax et P. ovale spécifiques de l'homme, in vivo dans un modèle de petit animal. De même, nous souhaitons également obtenir des souris primatisées, c'est-à-dire greffées avec des hépatocytes et des globules rouges de singes, puis infectées avec Plasmodium cynomolgi, espèce infectant les primates non humains. Ces modèles permettront d'étudier in vivo de nouveaux aspects de la biologie des parasites et de la réponse immune spécifique de ces parasites. Ces modèles seront également validés comme modèles pré-cliniques pour des essais thérapeutiques in vivo (médicaments, vaccins).

Le choix de la souris a ensuite été dicté par le fait qu'elle est le modèle le mieux développé et connu pour les greffes de cellules hétérologues, et d'ailleurs les lignées immunodéficientes et transgéniques ou knock-out pour les gènes d'intérêt permettant la greffe d'hépatocytes et de globules rouges hétérologues n'existent que chez la souris.

L'objectif à terme est d'établir ces animaux comme modèles pré-cliniques pouvant être utilisés en lieu et place des primates non-humains ("Remplacement"). La complexité de la production de ces animaux nous oblige per se à limiter le nombre minimal d'animaux par expérience ("Réduction"). Enfin, aucun animal ne sera hébergé seul dans une cage, les procédures en elles-mêmes n'induisent pas de douleur chez les souris, ou alors seulement une douleur légère à modérée, notamment lors de la greffe des hépatocytes humains, qui est calmée par l'administration d'un mélange d'anesthésique et d'analgésique aux animaux ("Raffinement").

Nous envisageons de produire 700 animaux par an afin d'utiliser 170 animaux de génotype d'intérêt pour réaliser nos expériences.

745- En aviculture, l'aliment représente un facteur particulièrement déterminant des résultats technico-économiques, mais aussi des rejets dans l'environnement et du bien-être animal. Un des pas les plus importants à faire pour la nutrition animale est de mieux connaître la digestibilité réelle des aliments en élevage, de manière à optimiser les réponses des animaux.

L'objectif de ce projet est de mettre au point une nouvelle méthode d'appréciation de la digestibilité de l'aliment pour un élevage de précision permettant une meilleure adéquation entre les apports et les besoins nutritionnels. Cette méthode sera basée sur des bilans digestifs simplifiés et s'appuiera sur l'utilisation d'un outil de mesure rapide, la spectroscopie dans le proche infrarouge (SPIR). Ceci permettra une plus grande souplesse dans l'acquisition des données et une plus grande pertinence vis-à-vis des conditions d'élevage. L'ensemble du projet est soutenu par le programme CASDAR (« DigSPIR » – Caractériser la valeur nutritionnelle des aliments par des méthodes innovantes de mesure de la digestibilité pour une aviculture durable) qui comprend 3 volets : le premier volet concerne la validation de la méthode SPIR à partir d'échantillons disponibles provenant d'essais déjà réalisés, le second volet qui fait l'objet du présent dossier porte sur la mise au point d'une méthode de bilan digestif simplifiée plus proche des conditions d'élevage, le troisième volet consiste à valider la méthode sur le terrain.

Le projet consiste à réaliser des bilans digestifs d'une gamme la plus large possible d'aliments pour poulet, selon la méthode de référence (bilan digestif avec collecte totale des excréta et analyse chimique). Les échantillons seront ensuite traités par SPIR, afin de comparer les deux méthodes.

Le projet porte sur 200 poussins de chair (Gallus gallus) de génotype commercial dont 120 seront utilisés en bilan digestif à l'âge de 3 semaines. L'objectif finalisé est d'améliorer la gestion nutritionnelle des élevages tout en limitant l'utilisation de cages pour bilan digestif.

Respect des 3R : cet essai ne peut être réalisé que sur l'espèce cible. L'utilisation de cages individuelles entre 15 et 25 jours d'âge permet d'obtenir des données individuelles et des résultats statistiques interprétables en recourant à un nombre limité d'animaux, supportant bien l'élevage en cages, pendant une durée suffisante et pas trop longue pour exploiter les performances zootechniques et éviter les troubles locomoteurs pour les animaux.

746- Le potentiel thérapeutique de l'utilisation des propriétés immunosuppressives des cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) a été démontré dans de nombreux modèles de pathologies inflammatoires chroniques auto-immunes dont la colite. Sur la base de ces données précliniques obtenues chez la souris, les cellules Tr1 humaines ont pu être isolées, produites selon un procédé répondant aux exigences réglementaires de bonne pratique de fabrication (BPF) et utilisées dans un premier essai clinique de PhIIa chez les patients atteints de la maladie de Crohn avec des signes d'efficacité et une bonne tolérance. Ces résultats cliniques encourageants nous ont permis de préparer une seconde application clinique de cette approche utilisant les cellules Tr1 dans les pathologies articulaires en utilisant des cellules T spécifiques d'un antigène des articulations, le collagène de type II. Nous avons mis en évidence le potentiel thérapeutique de ces cellules T

régulatrices, Col-Treg, dans deux modèles murins de polyarthrite rhumatoïde, aigu et chronique. Associées aux données de pharmacodynamiques, pharmacocinétiques, de toxicologie réglementaire et à la génération de produits de thérapies cellulaires Col-Treg humains, nous avons obtenu l'autorisation de l'agence française du médicament (ANSM) pour un premier essai clinique chez des patients arthritiques réfractaires aux thérapies disponibles sur le marché.

Afin d'élargir l'utilisation des cellules Col-Treg et potentialiser les données de toxicité générées chez la souris, le présent projet cible leur utilisation dans les cas d'uvéites auto-immunes non infectieuses. En effet, l'expression du collagène de type II au niveau de l'humeur vitrée de l'œil associée à l'inflammation locale, laisse envisager que les cellules Col-Treg pourraient y médier leur activité immunosuppressive. L'ensemble des expériences décrites dans le présent projet représente un nombre de 1814 souris. Dans le respect des 3Rs, la définition de l'incidence clinique des différents modèles d'uvéites assurera la réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril l'obtention des données précliniques à l'aide d'outils statistiques.

Parmi les pathologies ophtalmiques, les uvéites non infectieuses auto-immunes représentent annuellement plus de 70 000 personnes entre 20 à 40 ans soit plus de 10% des cas de cécité aux USA. Il s'agit d'une inflammation intraoculaire chronique sans causes infectieuses qui selon l'agence européenne représente moins de 5 cas par 10 000 (EMA, mars 2010) et qui peut être liée à des complications d'autres pathologies auto-immunes. Ces personnes ont une qualité de vie amoindrie et n'ont pas, à l'heure actuelle, de traitements curatifs. Les patients reçoivent principalement des traitements à base de corticoïdes ou plus récemment des traitements biologiques visant à bloquer des acteurs de l'inflammation tels que le TNF $\alpha$ . Il existe un réel besoin médical non satisfait chez ces patients pour lesquels l'utilisation des Col-Treg, pourrait être bénéfique. Pour pouvoir soumettre un essai de clinique chez l'Homme, il nous faut tout d'abord mettre en évidence les propriétés des Col-Treg in vivo dans des modèles d'uvéites chez l'animal. Pour cela, nous nous proposons de mettre en place deux modèles, chronique et aigu, d'uvéite chez la souris afin de pouvoir tester la sécurité et l'efficacité de l'administration des cellules Col-Treg et analyser leur devenir in vivo après injection. Ces deux modèles devraient nous permettre de collecter les données précliniques nécessaires à la constitution du dossier réglementaire de soumission d'essai clinique auprès de l'ANSM.

747- L'obésité est associée à un état d'inflammation chronique induit en partie par une dérégulation de l'activité sécrétoire du tissu adipeux. Cet état inflammatoire peut avoir un impact sur la physiologie d'autres tissus de l'organisme dont le système nerveux central. Ainsi, une alimentation trop riche entraîne, d'une part, un développement exacerbé du tissu adipeux conduisant à un surpoids à l'obésité et peut, d'autre part, augmenter le risque de neuroinflammation. Des études cliniques mais aussi l'étude de modèles animaux ont montrées un lien entre le surpoids/l'obésité et les maladies neurodégénératives.

Ce projet vise à comprendre les mécanismes reliant l'inflammation à la vulnérabilité du système nerveux central aux agressions. La réponse inflammatoire des cellules gliales ainsi que celle des cellules astrocytaires face à divers stimuli est étudiée in vitro par notre laboratoire. Afin de compléter les données déjà obtenues grâce aux cultures cellulaires, nous souhaitons étudier ces mêmes réponses in vivo sur un modèle murin.

Ce protocole expérimental propose d'étudier les effets de l'inflammation sur le système nerveux central en utilisant un modèle d'injection de LPS sur souris OF1.

Les souris OF1 âgées de 8 semaines recevront une injection de LPS ou du véhicule indifféremment de leur sexe. Le LPS induit dans un premier temps une réaction de neuroinflammation qui se traduit par l'activation des microglies résidentes suivie de l'activation des astrocytes. La durée d'exposition au LPS varie entre 2h et 5 jours post injection.

Un échantillon de 5 souris par conditions et par temps post-injection devrait permettre d'avoir des résultats exploitables et d'effectuer des comparaisons statistiques entre les groupes tests ainsi que des groupes contrôles (véhicule), soit au total 105 souris. L'inflammation induite par le LPS est suivie au cours du temps par des analyses des cytokines plasmatiques circulantes ainsi que des analyses histologiques, biochimiques et moléculaires de l'hippocampe.

Mesure prise pour respecter la règle des 3 R :

Remplacement : Des études in vitro ont déjà été menées. Ces études dans des modèles cellulaires rendent compte de la réponse d'un type cellulaire, mais ne peuvent représenter toutes les interactions complexes présentes dans le système nerveux central. Il est donc indispensable de compléter nos études in vitro par des études in vivo.

Réduction : Le nombre d'animaux a été calculé au plus juste afin d'avoir des résultats exploitables d'un point de vue statistique. Ce nombre d'animaux est basé sur une analyse des résultats par une analyse de la variance (ANOVA) qui permet dans des conditions contrôlées des comparaisons multiples.

Raffinement : Les animaux seront suivis plus particulièrement pendant les 24 heures post injection.

748- L'obésité est associée à un état d'inflammation systémique induit en partie par une dérégulation de l'activité sécrétoire du tissu adipeux. Cet état inflammatoire peut avoir un impact sur la physiologie d'autres tissus de l'organisme dont le système nerveux central. Ce projet vise à comprendre les mécanismes reliant l'inflammation à la vulnérabilité du système nerveux central aux agressions. La réponse inflammatoire des cellules gliales ainsi que celle des cellules astrocytaires face à divers stimuli est étudiée in vitro par notre laboratoire. Afin de compléter les données déjà obtenues grâce aux cultures cellulaires, nous souhaitons étudier ces mêmes réponses in vivo sur un modèle murin.

L'intérêt de ce projet est de passer à un autre niveau de complexité à travers l'étude de la neurodégénérescence induite sur le modèle de souris OF1. Nous utiliserons le modèle déjà établi de lésions au triméthylétain (triméthyltin ou TMT).

L'injection de TMT à des souris induit un phénomène de neurodégénérescence principalement localisé dans la région du gyrus denté de l'hippocampe. Le TMT induit dans un premier temps une réaction d'inflammation aiguë qui se traduit par l'activation des microglies résidentes suivie de l'activation des astrocytes. Le premier objectif est de valider ce modèle et de caractériser d'un point de vue biologique et biochimique l'effet du TMT sur le système nerveux central. Un deuxième objectif consiste à tester un potentiel effet anti-inflammatoire et antioxydant d'un composé issu de la biodiversité de l'île de la Réunion, la curcumine.

Un premier protocole incluant 80 souris OF1 âgées de 21 à 23 jours suivra les effets de la neuropathie induite par le TMT au cours du temps par des analyses histologiques, biochimiques et moléculaires de l'hippocampe. Un échantillon de 5 souris par condition et par temps post injection permet d'avoir des résultats exploitables et d'effectuer des comparaisons statistiques entre les groupes tests ainsi que des groupes contrôles (véhicule). Dans un deuxième protocole de 160 souris OF1 du même âge, le TMT sera combiné à des composés anti-inflammatoires et antioxydants tels que la curcumine et ses dérivés (CPL et CPO) afin d'évaluer leur potentiel effet bénéfique dans la limitation de la neurodégénérescence. La durée d'exposition au TMT combiné ou non à la curcumine ou ses extraits varie entre 2 heures à 8 jours post injection afin de suivre au cours du temps les marqueurs de la production de cytokines pro-inflammatoires suivie de l'activation des microglies et des astrocytes.

Mesure prise pour respecter la règle des 3 R :

Remplacement : Des études *in vitro* ont déjà été menées. Ces études dans des modèles cellulaires rendent compte de la réponse d'un type cellulaire, mais ne peuvent représenter toutes les interactions complexes présentes dans le système nerveux central. Il est donc indispensable de compléter nos études *in vitro* par des études *in vivo*.

Réduction : Le nombre d'animaux a été calculé au plus juste afin d'avoir des résultats exploitables d'un point de vue statistique. Ce nombre d'animaux est basé sur une analyse des résultats par une analyse de la variance (ANOVA) qui permet dans des conditions contrôlées des comparaisons multiples.

Raffinement : Les animaux seront suivis plus particulièrement pendant les 24 heures post injection. Les souris seront hébergées individuellement, afin de maintenir le confort des animaux et de prévenir les problèmes dus à une agressivité accrue.

Mesure prise pour respecter la règle des 3 R :

Remplacement : Des études *in vitro* ont déjà été menées. Ces études dans des modèles cellulaires rendent compte de la réponse d'un type cellulaire, mais ne peuvent représenter toutes les interactions complexes présentes dans le système nerveux central. Il est donc indispensable de compléter nos études *in vitro* par des études *in vivo*.

Réduction : Le nombre d'animaux a été calculé au plus juste afin d'avoir des résultats exploitables d'un point de vue statistique. Ce nombre d'animaux est basé sur une analyse des résultats par une analyse de la variance (ANOVA) qui permet dans des conditions contrôlées des comparaisons multiples.

Raffinement : Les animaux seront suivis plus particulièrement pendant les 24 heures post injection.

749- Le protocole expérimental consiste à étudier chez la vache laitière les effets, notamment sur l'état inflammatoire de la mamelle, du passage de 2 traites/jour à 1 traite/jour pendant une durée de 3 semaines, et d'un retour ensuite à 2 traites/jour.

L'essai concerne 61 vaches laitières croisées Holstein x Normande multipares, alimentées de façon à couvrir leurs besoins nutritifs et réparties dans 3 groupes. L'essai comprend 2 phases pour les 2 premiers groupes, et 1 seule phase pour le dernier groupe. Chaque phase se compose de 3 périodes: une période pré-expérimentale de référence durant laquelle les animaux sont traités 2 fois/jour; une période expérimentale où les animaux ne sont traités que le matin; une période post-expérimentale avec un retour à 2 traites/jour.

Cet essai a pour objectifs 1) de caractériser finement les mécanismes de la réponse inflammatoire mis en œuvre lors du passage à la monotraite; 2) de valider sur une population génétiquement différente, les premiers phénotypes prédictifs de l'aptitude à la monotraite, phénotypes qui ont été identifiés dans des essais précédents; 3) d'étudier la répétabilité de cette aptitude grâce aux 2 phases de monotraite prévues; 4) de compléter une base de données existantes afin d'étudier le déterminisme génétique de l'aptitude à la monotraite, à l'origine d'au moins une partie de la variabilité interindividuelle observée.

Il n'existe pas de méthodes alternatives à cette expérimentation car:

1) la réponse étudiée se situe au niveau de l'animal. L'omission d'une traite sur tout ou partie de la lactation est une pratique d'élevage courante. Différents essais de monotraite ont montré que les animaux s'habituent très rapidement à cette pratique en réduisant la quantité de lait produite, et manifestent peu de signes d'inconfort ou de comportements particuliers.

2) cet essai qui est réalisé sur des vaches laitières croisées Prim'Holstein x Normande issues de grandes familles, complète une base de données permettant d'étudier le déterminisme génétique des caractères d'aptitude à la monotraite.

L'adaptation de la mamelle au changement de rythme de traite, son état inflammatoire ainsi que les conséquences sur la composition du lait seront évalués par l'analyse d'échantillons de lait et de sang. Les échantillons de lait seront prélevés soit de manière classique par prélèvement automatique lors de la traite par la machine à traire, soit de manière manuelle par quartier en fonction du type d'analyses à réaliser. Ces prélèvements de lait ne demanderont aucune intervention particulière sur les animaux.

Afin de minimiser la douleur, les prises de sang seront réalisées au niveau de la queue des animaux. Le volume total prélevé sera inférieur à 10% du volume sanguin, et le protocole permettra la reconstitution rapide du volume sanguin avec des prises de sang peu fréquentes et espacées de 24 heures.

750- La perméthrine est un pesticide appartenant à la famille des pyréthriinoïdes qui est aujourd'hui la famille la plus utilisée tant pour les usages agricoles que domestique en

France. Contrairement à d'autres pays tel que les Etats-Unis (US EPA, 2009), la perméthrine n'est plus approuvée en Europe depuis 2000 sur culture en tant que produit phytopharmaceutique. En revanche, elle est autorisée et utilisée en tant que biocide pour les usages insecticides domestiques ainsi que pour les produits vétérinaires et les usages médicaux dans les lotions anti-poux. Du fait de son usage, la perméthrine est principalement émise dans l'air. Cependant, à cause de ses propriétés physiques, elle va majoritairement contaminer les surfaces, les sols et éventuellement les eaux de surface.

On estime que l'exposition de la population générale aux pyréthriinoïdes provient principalement de l'alimentation et de l'air intérieur en particulier avec l'utilisation domestique d'insecticides. En milieu intérieur, elle est à l'abri des principaux facteurs de dégradation et peut donc persister dans les poussières et les surfaces poreuses.

La perméthrine n'est pas considérée comme une substance tératogène. En revanche, l'impact de la perméthrine sur le système nerveux central et en période de développement est suggéré (INSERM, 2013).

De récentes études de biosurveillance ont montré une exposition des femmes enceintes aux pesticides notamment les pyréthriinoïdes, exposant ainsi le fœtus à un risque potentiel. Il n'est pas possible de disposer directement des données d'exposition au niveau du cerveau du fœtus humain.

L'objet de ce projet est de déterminer la biodistribution tissulaire maternelle et fœtale de la perméthrine chez le rat lors d'une exposition quotidienne répétée par voie orale durant toute la période de gestation. La perméthrine sera ainsi dosée chez les mères au niveau des tissus suivants : cerveau, foie, rein, muscle, glande mammaire, graisse et placenta ainsi que dans le sang et les excréments (urines et fèces).

Les métabolites les plus souvent utilisés en biosurveillance pour évaluer l'imprégnation des populations à la perméthrine seront également dosés dans le sang, les urines, les fèces et le foie. Chez les fœtus, la perméthrine et les métabolites seront dosés dans le sang, le foie et le cerveau.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 133 rats, nombre minimal nécessaire pour avoir des résultats suffisants et statistiquement exploitables.

Les données de toxicocinétique générées seront utilisées pour développer un modèle toxicocinétique basé sur la physiologie (PBTK) prenant en compte la gestation chez le rat. Une fois validé chez le rat, le modèle sera extrapolé à l'Homme afin d'estimer les doses internes d'exposition à la perméthrine de la femme enceinte et du fœtus.

Le développement de ce type de modèle, s'inscrit dans le cadre de la règle des 3R et du développement d'alternatives à l'expérimentation animale. En effet, une fois validé, ce modèle pourra être utilisé pour simuler les résultats d'une exposition à la perméthrine avec d'autres scénarios d'exposition sans recourir à l'expérimentation animale.

751- Ce projet a pour principal but d'étudier les effets de l'administration de statines sur l'addiction aux drogues et les mécanismes neurobiologiques responsables de ces effets. Les statines sont des molécules prescrites chez l'homme pour réduire l'hypercholestérolémie, mais elles peuvent également avoir d'autres effets indépendants de la synthèse du cholestérol. En effet, il a récemment été démontré qu'un traitement chronique avec une faible dose de statine, la Simvastatine, produit des effets sur le cerveau similaires à ceux de l'exposition des rats à un environnement enrichi. Comme nous savons que l'exposition à un environnement enrichi pendant une période d'abstinence réduit le risque de rechute à la cocaïne, notre hypothèse de travail est que l'administration de Simvastatine puisse avoir également des effets positifs vis à vis de l'addiction aux drogues. Ce projet vise donc à caractériser les effets des statines dans des modèles animaux d'addiction et à étudier les mécanismes neurobiologiques responsables des effets de ces statines.

Pour cela, nous allons réaliser chez le rat : 1) des mesures comportementales dans la consommation de drogue et la rechute; 2) des mesures neurobiologiques des changements cérébraux induits par les statines.

Afin de caractériser les effets des statines nous déterminerons: 1) si d'autres statines que la Simvastatine sont efficaces contre la rechute; 2) si les statines sont efficaces dans le traitement de l'addiction à différentes drogues (cocaïne, nicotine, opiacées ; alcool) ; 3) si les effets des statines perdurent après l'arrêt du traitement; 4) si les statines peuvent diminuer non seulement la rechute mais aussi la prise de drogue.

Pour la neurobiologie, nous mesurerons les taux cérébraux et le niveau d'activation de protéines sensées être altérées par la drogue et/ou le traitement avec une statine.

En résumé, toutes les expériences se découpent en 3 phases.

La phase 1, qui correspond à la chirurgie, consiste à implanter à demeure un cathéter dans la veine jugulaire de chaque rat.

La phase 2, qui correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue.

La phase 3, qui correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats sont traités ou non par une statine.

Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut être mené uniquement sur un animal vivant. Néanmoins nous avons pris en considération la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Pour cela nous utilisons des méthodes expérimentales validées et reproductibles et des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettent de réaliser plusieurs

comparaisons entre les groupes et de limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous avons calculé que pour cette étude, 672 rats seront nécessaires pour obtenir des données analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

752- Les effets des pesticides sur la santé humaine sont devenus aujourd'hui une question importante. Nous émettons l'hypothèse que les facteurs environnementaux et précisément les pesticides, peuvent avoir un impact sérieux sur les mécanismes épigénétiques et pourraient modifier l'expression des gènes dans les cellules germinales, entraînant une fertilité réduite. Notre travail consiste à étudier la méiose qui permet la production des gamètes chez les mammifères, dont l'homme, par des techniques de biologie moléculaire et cellulaire.

Pour valider notre hypothèse, nous utiliserons la souris comme modèle animal. Nous étudierons les effets de 2 pesticides chez les souris adultes et sur les descendants des souris femelles traitées. Pour chaque pesticide testé (atrazine, chlordécone), plusieurs groupes d'animaux seront constitués: Groupes « contrôles » et plusieurs groupes « traités ». Les pesticides seront administrés par voie orale ou par injection pendant des périodes variables, à des doses différentes. Pour ces études, 2440 animaux seront traités et parmi eux, 1160 animaux seront utilisés pour les analyses biologiques ultérieures. Le nombre d'expériences minimal est de deux. La répétition est nécessaire car les variations d'un animal à l'autre augmentent l'écart type et conduisent à des difficultés d'interprétations des données. La méthode statistique envisagée est celle du test de Student (test paramétrique) si les groupes fournissent des valeurs de distribution normale et de variances homogènes ; Sinon, des tests de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney seront effectués (non paramétriques) (Réduction).

On utilisera des animaux vivants car la méiose, mécanisme complexe, n'est pas reproductible in vitro (Remplacement). Enfin, nous appliquerons les points limites si les animaux traités aux pesticides présentent des signes de souffrance (Raffinement).

753- En France, la proportion de personnes obèses oscille entre 12 et 20% en fonction des régions. Ceci a amené les pouvoirs publics à considérer la situation comme étant un véritable problème de santé publique avec de nombreuses actions visant à sensibiliser la population. Cependant, les causes de l'apparition de ce profil obèse sont nombreuses et l'implication de substances toxiques présentes dans l'environnement comme les pesticides est de plus en plus étudiée. En effet, il a été observé que les régions les plus touchées par ce fléau sont souvent des régions fortement agricoles.

Dans une étude précédente, nous avons observé que des jeunes rats issus de mères exposées pendant la gestation et l'allaitement tous les jours à de faibles quantités d'un pesticide, le chlorpyrifos, avaient une prise de poids supérieure à des congénères non soumis au pesticide au cours des premières semaines de vie. Aussi, nous voulons savoir, dans cette étude, si ces jeunes rats, soumis à la même exposition, sont plus sujets à développer un état d'obésité à l'âge adulte, et ce, d'autant plus que leur régime alimentaire est riche en lipides.

Pour répondre à cette hypothèse, nous administrerons tous les jours par voie orale le chlorpyrifos à des femelles gestantes et allaitantes puis à leurs petits au cours du reste de l'étude. Nous comparerons l'évolution de poids et de la quantité d'aliments ingérés des jeunes mâles et des femelles issus de ces gestations alors qu'ils seront soumis soit à un régime alimentaire normal soit à un régime alimentaire riche en lipides et ce, jusqu'à l'âge adulte. La dose utilisée sera représentative de celle à laquelle nous pouvons être exposés et identique à celle que nous avons utilisée précédemment. Ce travail a reçu une subvention publique suite à une expertise scientifique.

Comme l'obésité est une maladie qui se développe dès la naissance et qu'elle perturbe différents organes, nous devons de recourir à l'animal. Nous avons choisi le rat car le modèle d'induction de l'obésité par un régime riche en graisses est bien documenté dans cette espèce et parce que les résultats antérieurs ont été obtenus sur cette espèce. D'autre part, compte tenu des analyses ultérieures envisagées, nous devons prélever des pièces de tissus suffisamment grandes et ceci n'est pas possible avec des vertébrés des classes inférieures. Cette étude est inédite dans son approche. Nous aurons besoin de constituer 8 groupes de 6 animaux minimum par groupe de rats à partir de 10 couples pour obtenir le minimum d'animaux requis par groupe afin de pouvoir analyser et conclure sur les données obtenues, soit au plus une centaine d'animaux (parents inclus) pour la durée de l'étude. Compte tenu des objectifs de l'étude et des contraintes expérimentales, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R.

754- L'objectif du présent projet est la mise en place d'un modèle d'arthrose chez le rat. Ce projet représente l'étape préliminaire d'un projet de plus grande ampleur dont l'objectif final est l'élaboration d'un kit permettant le traitement de l'arthrose chez le grand quadrupède (en particulier le chien). Plus précisément, ce kit permettra la purification de cellules souches dérivées du tissu adipeux qui seront couplées à des bio-polymères afin d'optimiser leur survie et leur pouvoir thérapeutique. A moyen terme, ce travail et l'expérience acquise chez l'animal permettront de monter une étude clinique chez l'homme pour traiter ce type d'affection très répandue et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe.

Au préalable, ce projet nécessite une phase d'expérimentation chez le rat afin de valider le modèle expérimental qui servira par la suite à tester et optimiser les combinaisons cellules/bio-polymères pour traiter la pathologie. Ce modèle expérimental consiste à provoquer une lésion arthrosique au niveau du genou (articulation fémoro-tibiale). Cette lésion sera provoquée de manière chirurgicale par section du ligament croisé antérieur.

La procédure nécessite l'utilisation d'un total de 40 rats (Wistar), dont 22 pour se former à l'acte chirurgical, puis 18 pour valider la durée post-lésionnelle optimale permettant le déclenchement d'une lésion arthrosique.

Le but est de réaliser la chirurgie de manière homogène et reproductible chez l'ensemble des rats expérimentés. Concernant les 22 rats, la maîtrise de la chirurgie étant « opérateur dépendant », ce chiffre pourra être revu à la baisse si le geste chirurgicale est maîtrisé plus tôt que prévu.

La validation du modèle sera effectuée par analyse histologique des articulations après sacrifice des animaux. Pour les 18 rats, trois temps d'induction de l'arthrose post-chirurgie seront testés, avec 6 rats par temps. Il s'agit d'une étude randomisée qui permettra d'analyser pour chaque temps : 3 articulations lésées, 3 articulations non lésées, et 3 articulations « témoins de chirurgie » (consistant à ouvrir la capsule articulaire puis refermer par sutures sans sectionner le ligament).

Concernant les mesures prises pour le respect du Raffinement (règle des « 3R »), l'ensemble des chirurgies sera pratiqué sur animaux endormis, sous anesthésie générale gazeuse (isoflurane). Afin de soulager la douleur postopératoire, l'injection sous-cutanée d'analgésique (buprénorphine) sera effectuée juste avant le réveil puis 2 fois par jour pendant 4 jours, en fonction des observations lors du suivi quotidien. Les animaux seront en effet suivis quotidiennement pour vérifier l'état de santé général et objectiver tout signe de douleur (et donc adapter l'analgésie). De plus, les animaux seront hébergés dans un environnement calme, en accord avec la réglementation, et le change sera réalisé 2 fois par semaine pour maintenir un état de propreté optimal des cages et éviter les infections inopinées. Seulement 3 rats seront placés dans une même cage (par lot expérimenté) et des cages propres seront utilisées juste après l'acte chirurgical afin d'éviter toute infection inopportune post-chirurgie. L'accès à l'eau et à la nourriture sera facilité si les animaux présentent un handicap les empêchant de se mettre debout et de grimper aux grilles de la cage.

755- Notre plateforme de recherche possède un outil d'imagerie préclinique de pointe dédié au petit animal. Ce scanner possède plusieurs modalités : les imageries TEP (Tomographie par Emission de Positons) et TEMP (Tomographie par Emission Mono-Photonique) permettant le suivi des radiotraceurs ; et également un TDM (TomoDensitoMètre) ou également appelé scanner de rayons-X pour l'obtention d'images anatomiques. Les acquisitions obtenues par les trois modalités de l'appareil sont reconstruites pour donner des images dynamiques d'une très grande précision.

L'utilisation de cet outil technologique nécessite la formation du personnel affecté au service d'imagerie préclinique pour chaque radioélément utilisé (émetteur de positons et de photons gamma) pour l'expérimentation in vivo sous la caméra. Cette étape de formation doit être réitérée pour tout nouvel expérimentateur pour son habilitation à utiliser la machine.

Dans un premier temps, la formation se déroulera sur des « fantômes » (tubes ou seringues contenant de la radioactivité), puis dans un deuxième temps sur des animaux. Six souris et six rats seront utilisés pour ce protocole de façon à alterner les animaux et pour un souci d'attente de décroissance de la radioactivité. Il s'agira de 12 animaux dédiés à la formation uniquement. Ils seront maintenus en entretien lorsqu'il n'y aura plus de formation puis réutilisés lors des formations suivantes. L'imagerie est un acte non invasif n'engendrant pas de douleur chez l'animal, cependant, l'état général des animaux sera tout de même suivi par un vétérinaire.

De plus, conformément à la réglementation 2013 concernant l'hébergement des animaux utilisés à des fins scientifiques, les animaux seront logés dans des cages adaptées à l'intérieur des salles de stabulation de l'animalerie où l'ambiance est parfaitement contrôlée (hygrométrie, température, ventilation, bruit). Ces cages sont par ailleurs équipées d'enrichissement pour limiter le stress.

756- L'arthrose est une affection chronique qui se manifeste par des douleurs persistantes aux articulations causées par l'usure anormale du cartilage et de l'ensemble de l'articulation. Les premiers signes de la pathologie se manifeste par des douleurs, des raideurs et des gonflements au niveau des articulations, accompagnées ensuite par une gêne fonctionnelle et une altération de la qualité de vie. Le projet s'inscrit dans une double problématique de santé publique concernant l'arthrose:

1. Le manque d'outils diagnostiques sensibles et spécifiques, particulièrement en imagerie
2. L'absence de traitements étiologiques de la maladie.

Notre plateforme de recherche possède un imageur dédié à la recherche sur le petit animal ayant plusieurs modalités : TEP (Tomographie par Emission de Positons) – TEMP (Tomographie par Emission monophotonique) – TDM (Tomodensitométrie) ou plus couramment appelé Rayons X.

Un des volets de recherche du laboratoire est celui de mettre au point des nouveaux traceurs TEMP et TEP à la fois sensibles et spécifiques du cartilage.

Pour cela nous devons dans un premier temps créer un modèle d'arthrose chez l'animal qui doit être stable et reproductible.

Le choix de l'espèce doit être en adéquation avec les possibilités de l'imageur. Le rat est le plus adapté car il permet une meilleure résolution sur l'image obtenue (structure articulaire plus grande que la souris).

Pour la création du modèle nous avons choisi une méthode développée par une équipe américaine. L'arthrose est induite chimiquement par injection de monosodium iodoacetate (MIA) dans le genou droit du rat. Une semaine plus tard les études histologiques montrent des lésions sur le cartilage. C'est à ce moment-là que nous réaliserons les examens

d'imagerie TEP/TEMP avec des traceurs déjà connus et utilisés en clinique : 18FDG, 18FNa et 99mTc-MDP. Nous ferons également des examens radiographiques avec la modalité TDM du même imageur.

Nous avons réduit l'étude à 2 lots de 3 rats (6 rats en tout).

Le premier lot servira de contrôle en deux temps :

- Nous effectuerons l'imagerie sans aucune injection au niveau du genou ;
- Puis, sur ce même groupe contrôle, nous injecterons une solution saline dans le genou droit. L'imagerie sera faite avec un temps d'attente identique au deuxième lot (une semaine). Cela nous permettra de différencier les lésions arthrosiques liées à l'injection de saline par rapport à celles liées à l'acte invasif de l'injection de MIA.

Le deuxième lot sera composé de 3 rats également et recevra l'injection du MIA en intra-articulaire. L'imagerie sera réalisée une semaine après comme décrite précédemment.

Le suivi en imagerie permet de réduire le nombre d'animaux puisqu'il ne sera pas nécessaire de sacrifier des animaux à différents temps pour visualiser l'évolution de la pathologie. Par ailleurs, des imageries étant réalisées régulièrement il sera possible d'arrêter l'étude dès que la pathologie sera installée sans attendre que les animaux manifestent des signes de douleurs. Les procédures pouvant induire de la douleur aux animaux seront réalisées sous anesthésie générale et seront accompagnées de l'administration d'un composé morphinique.

De plus, conformément à la réglementation 2013 concernant l'hébergement des animaux utilisés à des fins scientifiques, les rats seront logés dans des cages adaptées.

757- La caudectomie est une procédure réalisée régulièrement et sous conditions réglementaires par les éleveurs de porc (directive 98/120/CE), afin de réduire les risques de caudophagie en phase d'engraissement, sources de douleurs importantes.

Cette pratique est cependant douloureuse pour l'animal et remise en cause. Du fait que les porcs sont destinés à la consommation de viande, l'utilisation des traitements pharmacologiques est très réglementée et les éleveurs disposent de très peu de moyens thérapeutiques pour réduire la douleur. Actuellement, les éleveurs de porc utilisent un antalgique de type anti inflammatoire non stéroïdien, le méloxicam, pour réduire la douleur liée à la castration. Ce traitement permet clairement de réduire la douleur post-opératoire mais a peu d'effet sur la douleur pendant la castration proprement dite. Ce traitement pourrait également réduire la douleur due à la caudectomie mais, à notre connaissance, il n'existe pas de données disponibles pour valider cette hypothèse. " est donc intéressant de voir dans quelle mesure le méloxicam peut réduire la douleur due à la caudectomie, afin, à terme, d'élargir l'utilisation de ce traitement par les éleveurs.

Cette étude s'appuie sur des indicateurs physiologiques (une prise de sang) mesurés sur 18 animaux par traitement, ainsi que des indicateurs comportementaux et zootechniques (24 animaux par traitement), soit en tout 252 porcelets.

758- Les biomédicaments regroupent diverses classes de médicaments dont le point commun est de faire appel à une source biologique comme matière première du principe actif qu'ils renferment (exemples : protéines thérapeutiques (hormones, facteurs de croissance, cytokines, anticorps). Les biotechnologies n'ont cessé d'apporter des améliorations aux procédés et l'industrie pharmaceutique a développé des biomédicaments de plus en plus sophistiqués comme par exemple les anticorps monoclonaux qui, de par leur conception, ciblent des mécanismes pathologiques extrêmement précis dans l'organisme malade. Les projets auxquels collabore notre équipe visent au développement de formulation nébulisable à visée pulmonaire pour délivrer localement dans le tractus pulmonaire des biomédicaments, par exemple un anticorps chez l'homme. Après avoir testé diverses formulations in-vitro et déterminé celle qui conservait au mieux les propriétés du biomédicament lors de l'aérosolisation sans en altérer ses propriétés pharmacologiques, il s'agit maintenant de valider le dispositif nébuliseur + formulation aérosolisée du biomédicament, dans un modèle animal pertinent, le primate non humain.

Le macaque cynomolgus, est l'espèce la plus pertinente pour cette étude. En effet, les primates non humains représentent un bon modèle pour évaluer le dépôt pulmonaire de médicaments par des générateurs d'aérosol car ils sont proches de l'Homme d'un point de vue de l'anatomie pulmonaire et sont capables de respirer par la bouche (contrairement aux rongeurs) ce qui est indispensable pour les études avec des générateurs à visée thérapeutique chez l'homme. L'utilisation de cochon n'est pas envisageable car la position allongée de leur poumon ne reproduit pas la verticalité des poumons humains et la respiration spontanée par masque (sans intubation) n'est pas possible. Parmi les primates non humains, nous avons choisi le macaque car : 1/ c'est une espèce de référence pour les études réglementaires des biomédicaments, notamment des anticorps thérapeutiques, 2/ en dehors de l'homme, c'est l'espèce de l'ordre des primates la mieux documentée d'un point de vue génomique et immunologique, 3/ la distribution et l'expression pulmonaire du récepteur FcRn qui participe à la distribution et la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques, est bronchique et similaire chez le macaque et chez l'homme.

Chaque étude sera réalisée chez 3 macaques, ce qui permettra d'évaluer le dépôt pulmonaire du biomédicament dans le tractus pulmonaire (zone alvéolaire) par le générateur d'aérosol en utilisant des méthodes d'imagerie radio-isotopiques. 3 animaux est le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité inter-individuelle (paramètres respiratoires).

Les animaux seront réutilisés pour un maximum de 10 biomédicaments (sans interaction) ou pour une durée totale maximale de 5 années. Entre chaque biomédicament, un « wash out » correspondant au minimum à la durée d'élimination du médicament du compartiment sanguin (anticorps environ 20-30 jours, autres protéines quelques jours) sera opéré.

759- Le Département R&D Immunologie souhaite développer des anticorps monoclonaux dirigés contre un marqueur spécifique d'une perturbation grave de l'hémostase, la CIVD (Coagulation IntraVasculaire Disséminée). Stago, dont le domaine d'activité est l'hémostase humaine, souhaite développer à l'aide de ces anticorps un réactif de diagnostic in vitro permettant de mettre en évidence cette pathologie.

L'objectif est de rechercher un anticorps réagissant contre une structure protéique subissant une modification suite à un clivage (néo épitope). Le but est de sélectionner des hybridomes sécrétant des anticorps spécifiques de ce néo-épitope. Les hybridomes sont obtenus par la technique d'hybridation cellulaire, consistant en la fusion des lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, avec une cellule de myélome dont l'origine est la souris Balb/C.

Une bibliographie a été menée afin d'explorer les techniques utilisées. Les protocoles décrits indiquent l'utilisation de souris consanguines Balb/C et ne signalent pas d'impact de l'antigène injecté sur la santé des animaux.

Afin d'augmenter les chances de réussite du projet, plusieurs protocoles d'immunisation seront nécessaires. Une quantité de 20 souris est prévue dans ce projet, à raison de deux souris par protocole, ceci afin d'augmenter les chances d'obtenir au moins une souris immunisée et susceptible de produire les anticorps recherchés.

Si les premières immunisations aboutissent à la sélection d'anticorps dont les spécifications sont celles attendues, les autres essais pourront ne pas être menés. Il s'agit ainsi de n'utiliser que le nombre d'animaux nécessaire.

Les temps d'immunisation peuvent varier de 2 à 5 mois.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux.

En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les animaux sont hébergés par deux, dans des cages prévues pour 4 animaux, afin de maintenir leur sociabilisation.

Des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des souris.

760- Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs primaires du cerveau pour lesquelles les thérapies actuelles sont peu efficaces. En effet, la survie médiane est de 15 mois après le diagnostic.

L'infiltration de ces tumeurs dans le parenchyme cérébral et la résistance des cellules souches des GBM aux traitements apparaissent être à l'origine de cet échec thérapeutique. Les expériences in vivo de ce projet ont pour but 1) de tester l'efficacité d'une nouvelle prodrogue inhibant une voie de signalisation active dans les cellules souches des GBM et 2) d'évaluer le rôle anti-invasif de neuropeptides dans l'infiltration des cellules de GBM. Le modèle animal de ces expériences sera le rat Wistar avec implantation intracérébrale de cellules C6 issues de GBM de rat Wistar. Après le développement de la tumeur, les traitements par la prodrogue seront délivrés par voie intracérébrale, ceux par les neuropeptides par voie intrapéritonéale. Le nombre de rats nécessaire pour cette étude dans un modèle orthotopique sera de 108. La règle des 3R est appliquée dans les domaines suivants. Des tests préalables in vitro et ex vivo ont été réalisés prouvant l'efficacité de la prodrogue sur les cellules de GBM C6 et son innocuité sur la viabilité des cellules normales du cerveau de rat. Ces expériences permettent d'avoir un ordre d'idée sur la dose à utiliser in vivo et ainsi de réduire le nombre de rats utilisés.

L'avantage de l'implantation intracérébrale des cellules C6 de rat Wistar est l'analyse de l'effet de la prodrogue et des neuropeptides dans un modèle orthotopique. L'injection intracérébrale de la prodrogue est nécessaire en raison d'une quantité limitée de prodrogue disponible et devrait permettre d'obtenir des effets plus importants et plus rapides que l'injection par voie intraveineuse réduisant ainsi le nombre de rats, la durée des traitements et évitant les éventuels effets systémiques. Les dommages escomptés sont une souffrance due à la chirurgie ou au développement des tumeurs. L'emploi d'analgésiques permettra de réduire la souffrance due à la chirurgie, et le protocole prendra fin à J19 après implantation, c'est-à-dire avant l'apparition des signes cliniques de souffrance dus au développement de la tumeur selon la littérature. Des points limites après chirurgie et traitements sont inclus dans le protocole. Ces expériences in vivo devraient permettre d'évaluer la pertinence de l'emploi de la prodrogue pour le traitement des GBM et de mieux comprendre la régulation de l'infiltration des GBM par les neuropeptides.

761- Ce projet vise à étudier les mécanismes qui déterminent la reconnaissance moléculaire lors de l'initiation des réponses immunitaires contre les tumeurs. Il intègre des problématiques de biologie cellulaire fondamentale (activation, transport intracellulaire, migration cellulaire) à des questions d'immunologie fondamentale (présentation des molécules étrangères appelées antigènes, stimulation des effecteurs du système immunitaire tels que les lymphocytes T), d'immunothérapie anti-cancéreuse (stratégie de vaccination thérapeutique anticancer basée sur la manipulation du système immunitaire pour contrôler le rejet des tumeurs). Parmi les cellules du système immunitaire, nos travaux porteront principalement sur les cellules dendritiques. Ces cellules font l'intermédiaire entre les cellules tumorales et l'ensemble du système immunitaire, grâce à un processus que nous appelons « présentation antigénique ». La présentation antigénique permet au système immunitaire de « voir » les cellules cancéreuses, ce qui représente la première étape d'une éventuelle réaction de rejet des tumeurs.

Le projet vise à comprendre les mécanismes fondamentaux d'initiation des réponses immunitaires par les cellules dendritiques. Ce processus est à la base de notre capacité de défense contre les infections virales, certaines infections parasitaires et bactériennes, ainsi que contre le cancer. Le projet va étudier les fonctions phagosomales de ces cellules dendritiques et le contrôle épigénétique de la mise en place de ces fonctions et leurs conséquences sur les réponses immunitaires. Les expériences animales proposées vont permettre d'identifier les mécanismes intégrés de défense immunitaire qui en résultent. Les découvertes que nous ferons dans ce cadre seront directement applicables dans le domaine de la vaccination, aussi bien contre les infections que contre le cancer.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera environ de 2300 animaux, dont 1200 animaux génétiquement modifiés. En accord avec les réglementations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal.

762- La procédure décrite dans ce projet concerne la création de modèle de thrombose veineuse chez le rat ou la souris dans le cadre de développement préclinique de produits pharmaceutiques, notamment à visée anti-thrombotique. La thrombose veineuse consiste à ligaturer la veine cave inférieure entraînant ainsi une stase veineuse et par conséquent la formation d'un thrombus. Ce modèle est largement décrit dans la littérature.

L'objectif de ce projet est dans un premier temps de valider le modèle chez la souris ou le rat au sein de notre laboratoire. Pour ce faire, une ligature de la veine cave inférieure sera réalisée. Puis, les animaux seront sacrifiés dans les 24 heures après l'induction du thrombus. La partie de la veine cave inférieure sur laquelle un thrombus se sera formé, sera prélevée et le thrombus sera pesé.

Une fois le modèle caractérisé, des études pharmacologiques seront menées sur ce modèle pour tester l'efficacité antithrombotique de substances. Le modèle étant de courte durée (24 heures), aucune antibiothérapie ne sera appliquée. Par ailleurs, pour éviter toute interférence sur la coagulation, aucun antalgique ni anti-inflammatoire ne sera administré en péri-opératoire. Néanmoins, un suivi des points limites (convulsions, prostration, automutilation) sera mis en place permettant de sacrifier l'animal dans les plus brefs délais, pour éviter toute souffrance inutile.

Même si des tests *in vitro* peuvent être réalisés au préalable afin de mettre en évidence les propriétés anti-thrombotiques des substances testées, ces propriétés devront être confirmées *in vivo*, dans le modèle animal. L'utilisation d'animaux (rongeurs principalement) est donc indispensable. Le choix de l'espèce rongeur est justifié par le fait que le modèle décrit dans ce projet est essentiellement validé chez les rongeurs.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à intégrer dans une même expérience la relation dose-effet, la comparaison par rapport à une substance de référence, et une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition du test. Un effectif de 12 animaux par groupe semble un minimum. Par ailleurs, nous estimons à 5 le nombre de groupes nécessaires dans une étude, incluant un groupe contrôle, 3 doses de substances pour la relation dose-effet, et un groupe référence (avec un produit ayant des propriétés anti-thrombotiques connues). Le nombre d'animaux dans une étude sera donc de 60. Nous estimons à 7 le nombre de molécules qui seront testées par an et par espèce, sur les 5 prochaines années (i.e. 2100 rats, 2100 souris).

763- Ce projet a pour but de révéler la fonction et la régulation d'un gène particulier au cours du développement chez la souris. La fonction de ce gène est pour le moment inconnue. Nous avons cependant précédemment démontré que son expression chez la souris est soumise à un contrôle extrêmement précis dans l'espace et le temps, et de plus conservé chez l'homme, présageant d'une implication spécifique et essentielle pour le développement. En effet, ce gène n'est exprimé qu'à partir de la copie chromosomique héritée du père, la copie portée par le chromosome héritée de la mère étant stablement réprimée tout au long de la vie par des processus dits épigénétiques. Ce gène fait donc partie de cette catégorie de gènes très rares que l'on appelle gènes soumis à empreinte génomique ou empreinte parentale. De plus, ce gène est fortement exprimé tout au début du développement embryonnaire, pendant les premiers jours après fécondation, dans le placenta au cours de la gestation puis son expression persiste en vie adulte principalement dans le testicule et le cerveau. Les produits des gènes soumis à empreinte parentale sont en général essentiels pour le développement *in utero* et pour les fonctions cérébrales après la naissance, et on les trouve impliqués dans plusieurs syndromes chez l'homme. Notre but est d'ici comprendre les mécanismes de régulation épigénétiques de notre gène soumis à empreinte d'intérêt et son rôle sur le développement et la physiologie adulte.

L'empreinte parentale, c'est à dire l'influence de l'origine parentale sur l'expression de certains gènes, est un phénomène spécifique des mammifères. Dans ce contexte, l'étude de notre gène d'intérêt requiert l'utilisation du modèle souris, et ne peut en aucun cas être menée sur d'autres modèles animaux (drosophile, poisson zèbre ou nématode). De plus, les fenêtres et tissus d'expression très spécifiques de notre gène (stade précoce du développement embryonnaire, testicule, cerveau) justifie le recours à une étude développementale sur animaux vivants pour comprendre la fonction de ce gène.

Nous proposons de développer 3 types de souris mutantes pour le notre locus d'intérêt: 1) délétion du gène en lui-même, 2) délétion d'une forme alternative de ce gène qui est la toute première forme exprimée après la fécondation, et 3) délétion d'une séquence régulatrice en amont de ce gène et qui porte tout au long de la vie la mémoire de l'origine parentale. La comparaison de ces différents modèles est nécessaire pour évaluer au mieux les différentes fonctions de la protéine codée par notre gène d'intérêt au cours de la vie et les éléments génétiques importants pour la régulation de son

expression. Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R : Réduction, en pratiquant des analyses d'ordres phénotypique, cellulaire et moléculaire sur le même animal ; Remplacement, par l'utilisation de systèmes cellulaires pour les approches biochimiques ; et Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants et l'application de procédures d'euthanasie en cas de signes de souffrance et de détresse de l'animal. Environ 300 animaux seront utilisés pour ce projet, en comptant les fondateurs et les descendants analysés. Nous disposons de financements nationaux et européens pour mener à bien cette recherche.

764- Ce projet porte sur le développement et l'optimisation de plasmides innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies telles que la myopathie de Duchenne. L'objectif est ici de mettre en évidence le bénéfice de motifs d'importation nucléaire en termes de niveau et durée d'expression du gène transféré, au niveau du muscle, chez l'animal in vivo. Ce projet fait suite à des expériences in vitro ayant permis de sélectionner les doses les plus pertinentes. Au cours de ce projet 32 souris Swiss seront utilisées. L'utilisation conjointe de l'imagerie de bioluminescence et de la recherche de marqueurs de l'inflammation par de simples prises de sang permet de limiter le nombre d'animaux nécessaire. Afin de réduire stress et douleur chez les animaux, l'administration des plasmides par méthode hydrodynamique sera faite sous anesthésie et sera suivie d'une analgésie durant 72 heures. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse.

765- Objectifs du projet :

Notre projet porte sur les conséquences à court, moyen et long terme de modifications précoces de l'alimentation, sur la survenue de pathologies cardio-vasculaires (hypertension artérielle, infarctus, insuffisance cardiaque) et métaboliques (surpoids, diabète, dyslipidémies). Pour ce projet, nous utiliserons un modèle de rongeur (rat, souris) soumis à une suralimentation postnatale, induite par une réduction du nombre de petits par portée (3 au lieu de 8). Au moment du sevrage, tous les animaux recevront une alimentation standard ad libitum.

Nous envisageons d'explorer au niveau du tissu cardiaque, quels gènes et quelles protéines voient leur expression modifiée par une modification post-natale du statut nutritionnel. Nous souhaitons d'autre part augmenter notre compréhension de la vulnérabilité du système cardiovasculaire vis-à-vis de situations pathologiques induites in vivo ou ex-vivo (ischémie-reperfusion du myocarde, diabète, insuffisance cardiaque induite par certains médicaments anticancéreux). Enfin, nous souhaitons envisager des possibilités de traitements, nutritionnels ou médicamenteux, susceptibles de limiter les atteintes cardio-métaboliques induites par la suralimentation postnatale chez le rongeur.

Avantages du projet :

Ce modèle est un modèle unique car il permet d'observer comment, en agissant à une période critique du développement des mammifères, celle qui suit immédiatement la naissance, des modifications de l'environnement nutritionnel peuvent agir de manière définitive sur le fonctionnement de différents organes (cerveau, cœur, foie, pancréas, reins, tissu adipeux, ...) et conduire à une plus grande susceptibilité de l'adulte à des pathologies cardio-métaboliques. Il se rapproche de situations rencontrées chez l'Homme (nouveaux nés de petit poids avec rattrapage rapide de croissance) et qui prédisposent ensuite l'adulte à un surpoids, une hypertension artérielle, des désordres du métabolisme du glucose et des lipides, qui font ensuite le lit des maladies cardiovasculaires.

Nombre et type d'animaux :

Notre travail engagera au maximum 1050 rongeurs (rats, souris).

Remplacement, réduction, raffinement :

Ce projet de recherche, qui repose sur des interactions entre différents organes (tissu adipeux, cerveau, foie, cœur et vaisseaux) ne peut malheureusement être approché par des techniques reposant sur la culture cellulaire. Il nécessite d'être conduit sur un animal entier, de sa naissance à sa maturité.

Ne seront utilisés que le nombre d'animaux strictement nécessaire et suffisant à la conduite du projet.

766- Le diabète de type 2 est une maladie métabolique complexe qui comprend des dysfonctionnements de la cellule bêta pancréatique sécrétrice d'insuline, ainsi que des tissus périphériques tels que le foie et le tissu adipeux. Depuis plusieurs années, nos laboratoires étudient les mécanismes moléculaires contrôlant la fonction des cellules impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique tels que les adipocytes, les hépatocytes et les cellules bêta pancréatiques. Récemment, nos deux équipes ont pu montrer sur des lignées cellulaires que les petits ARNs non codants (microARNs) pourraient être fortement impliqués dans le maintien de la fonctionnalité des cellules du métabolisme énergétique. Dernièrement, des analyses d'expression globale entre des situations pathologiques et/ou physiologiques, nous ont permis de mettre en évidence de nouveaux microARNs d'intérêt (pancréas et foie de rats diabétiques vs rats sains, adipocytes bruns humains vs adipocytes blancs). Par ailleurs, d'autres laboratoires ont montré que ces microARNs pouvaient, en empruntant la circulation, agir à distance de la cellule où ils sont générés, ouvrant de nouvelles perspectives quant au rôle biologique et endocrine des microARNs.

Notre objectif est maintenant de valider l'implication de nos microARNs candidats dans des cellules primaires, plus proches de l'état in vivo. Pour ce faire, nous envisageons de constituer une banque de tissus et de plasma de rats et de souris, qui nous permettront d'étudier les niveaux d'expression de nos microARNs candidats et leurs cibles potentielles dans la circulation ainsi que dans les tissus clés de l'homéostasie énergétique. En parallèle, l'utilisation de cellules primaires nous

permettra de décrypter les mécanismes moléculaires induits par ces microARNs dans des cellules non modifiées. Pour cela, nous réaliserons de manière régulière des préparations de cellules primaires à partir de tissus frais prélevés sur des rats et des souris. L'ensemble de ces procédures nécessitera 128 rats et 136 souris sur 5 ans. Ces animaux seront sains, non modifiés génétiquement et seront maintenus dans des conditions standards d'hébergement. La banque de tissu et les préparations de cellules primaires seront mutualisés entre deux équipes ce qui permet de réduire le nombre d'animaux.

767- Le projet est destiné à développer des électrodes neuronales multifonctionnelles qui peuvent être utilisées pour accéder à des aires cérébrales impliquées dans différentes maladies.

De nombreuses pathologies neurologiques peuvent être traitées en utilisant des impulsions électriques délivrées dans une aire cérébrale, appelée les ganglions de la base qui est situé au centre du cerveau. Cette thérapie a permis le développement de nombreuses sondes spécialement dessinées pour délivrer les impulsions électriques sur des structures de quelques millimètres sans produire des lésions sur les régions environnantes.

Avec l'utilisation de cette technique, les patients atteints de la maladie de Parkinson ont pu bénéficier d'une avancée considérable pour leurs traitements. De même cette avancée technologique a permis de traiter avec succès d'autres maladies telles que les troubles alimentaires, les dystonies, les troubles obsessionnels compulsifs ou encore les douleurs chroniques. Néanmoins, l'optimisation des sondes reste indispensable, en effet, la réduction de taille des contacts électriques, l'intégration d'enregistrement neuronal peuvent encore être améliorée. La réduction de la taille des contacts électriques pourrait réduire les complications médicales générées par des stimulations trop importantes des tissus environnantes. La possibilité d'enregistrer les réponses neuronales pourrait aussi aider les médecins à mieux adapter le stimulus électrique délivré.

Le but de cette étude est d'évaluer de nouveaux matériaux pour les électrodes servant à la stimulation et à l'enregistrement des ganglions de la base humain. Pour cela, nous proposons d'implanter dans les ganglions de la base des macaques des sondes multifonctionnelles. De plus l'analogie entre les tissus humains et ceux des macaques vont nous permettre d'étudier le degré de réaction inflammatoire de nos nouvelles sondes.

Tous les efforts ont été faits pour réduire le nombre des individus à trois. Pour maintenir la puissance statistique de l'échantillon, nous avons décidé d'augmenter le nombre des sites d'implantation par animal et de traiter chaque hémisphère individuellement. Nous avons intégré dans notre plateforme préclinique animale toutes les nouvelles recommandations issues des normes européennes et aussi des comités d'éthiques régionaux et nationaux en relation avec l'élevage, la nutrition, les interactions sociales et la surveillance de la douleur.

768- La maladie de Parkinson est une atteinte neurologique chronique et aujourd'hui incurable, qui touche 6,3 millions de personnes dans le monde. Les complications de la pathologie conduisent à un fort taux de mortalité et à une baisse de la qualité de vie. Le caractère chronique de la pathologie engendre de forts coûts de santé, pendant une longue durée. Par ailleurs, les thérapeutiques actuelles permettent d'atténuer les symptômes, mais ne sont ni curatives, ni ne ralentissent le développement de la pathologie.

En conséquence, la mise au point d'une thérapeutique novatrice favorisant un arrêt ou un ralentissement de la pathologie apparaît comme primordiale. Des études antérieures ont démontré le potentiel protecteur de la stimulation lumineuse. Nous-même avons mené plusieurs études confirmant ce potentiel sur un modèle de souris parkinsoniennes, via une illumination proche infra-rouge. En effet, l'illumination proche infrarouge permet une protection des régions cérébrales endommagées dans la maladie de Parkinson (entre autres, les neurones dopaminergiques de la substance noire), ce qui conduit à une réduction des troubles moteurs associés. D'autre part, aucun effet délétère de l'illumination proche infrarouge n'a, à ce jour, été décelé.

Afin d'étayer le potentiel de cette thérapeutique novatrice, nous souhaitons désormais la tester sur un second modèle de la maladie de Parkinson, chez le rat. En effet, la lésion induite par la 6-OHDA est sensiblement différente de celle induite par le MPTP. Ainsi, confirmer l'efficacité de la stimulation lumineuse sur un deuxième modèle de la pathologie, différent tant du point de vue de l'espèce que du mécanisme lésionnel, permettra d'étayer notre thérapeutique avant les études précliniques sur les primates et les essais cliniques chez l'Homme.

Par ailleurs, le modèle utilisé dans le présent protocole (rats injectés unilatéralement à la 6-hydroxydopamine) permet que chaque animal soit son propre contrôle (région controlatérale à l'injection saine), ce qui réduit à 100 le nombre de rats nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement fiables.

769- Les immunocytokines (anticorps monoclonal fusionné avec une cytokine, ICK) combinent les avantages des anticorps (ciblage et action cytotoxique directe au niveau de la tumeur) et les activités immunostimulantes puissantes des cytokines. Elles représentent une des nouvelles générations d'anticorps monoclonaux thérapeutiques développées pour répondre à une demande d'accroissement de l'index thérapeutique et du cycle de vie des médicaments.

Parmi toutes les cytokines qui existent, l'interleukine 15 (IL-15) est une molécule cruciale pour le développement des cellules du système immunitaire, pour leurs fonctions et leurs activations ainsi que pour leurs survies. Contrairement à l'interleukine 2 (IL-2) utilisée en clinique en humaine lors de la chimiothérapie, l'IL-15 est moins toxique. Elle est donc un candidat très attractif pour une utilisation comme adjuvant avec les anticorps monoclonaux et sous forme d'ICK afin de cibler la cytokine sur la tumeur. Des travaux effectués récemment ont permis de générer et breveter un superagoniste de

l'IL-15 (RU) sous la forme d'une protéine de fusion. Le RU présente une affinité et des effets biologiques très augmentés par rapport à l'IL-15.

Dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens (NHL) d'origine lymphocytaire B, elle pourrait se révéler intéressante en combinaison avec le rituximab, anticorps thérapeutique, qui cible l'antigène CD20 exprimé à plus de 90% sur la surface des lymphocytes B des NHL. L'intérêt d'une telle combinaison réside dans le fait que le rituximab est le traitement de première ligne pour le NHL, mais de nombreux patients deviennent résistants à cette thérapie et rechutent. Grâce à leur capacité à recruter efficacement et à stimuler *in situ* les effecteurs, pourraient augmenter l'efficacité des traitements et notamment diminuer ce taux de rechute.

Avant d'envisager de mettre au point l'ICK, l'activité de la RU doit être effectuée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer *in vivo* l'activité de cette RU associée ou non à un anticorps monoclonal dans un modèle de lymphomes B humain xéno greffé chez la souris SCID. Le nombre d'animaux utilisés sera de 48 souris, réparties en 6 groupes de 8 souris. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinements. En effet, les molécules ont été évaluées *in vitro* dans un premier temps, (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur *et/ou* l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

770- En aquaculture, les poissons d'élevage doivent faire face à des variations non contrôlées de la qualité de l'eau. Un grand nombre de paramètres de qualité de l'eau a été montré comme affectant significativement la physiologie et le bien-être des espèces d'élevage. La recherche aquacole doit donc s'intéresser à la robustesse des espèces à une perturbation environnementale.

Des différences importantes de sensibilité à une perturbation ont été mises en évidence sur des lignées isogéniques (dans une lignée chaque individu possède le même patrimoine génétique) de truite arc-en-ciel. Ces différences de sensibilité apportent des informations intéressantes quant à la caractérisation de la robustesse de ces lignées.

En effet, la sensibilité à l'environnement est un des éléments clés de la robustesse, puisqu'elle est la première étape des processus d'adaptation.

Les perturbations ont été appliquées sur des individus naïfs, c'est-à-dire, qui n'ont pas connu la perturbation durant leur histoire de vie. Nous avons donc caractérisé une sensibilité face à un événement nouveau et par conséquent nous avons émis des hypothèses sur leur capacité à faire face à un événement inconnu. Cependant, certains individus peuvent être très sensibles à un nouveau stress mais être potentiellement pourvus de bonnes capacités d'acclimatation lorsque la perturbation est répétée.

Ainsi, afin de caractériser la robustesse des lignées clonales, il paraît indispensable d'estimer leur capacité d'acclimatation à une perturbation donnée.

Cette étude vise à modéliser les réponses physiologiques et comportementales au cours du temps suite à un stress aigu et répété d'hypercapnie (augmentation de la quantité de CO<sub>2</sub> dans l'eau) chez la truite arc-en-ciel. La truite arc-en-ciel est la principale production piscicole de France et du fait de son appartenance à la famille des salmonidés, elle est également une espèce modèle pour les élevages de saumons.

Ces mesures seront comparées entre deux lignées isogéniques présentant des divergences de réponses au stress.

L'étude sera réalisée sur des poissons d'environ 80g élevés dans les conditions standard, auxquels nous appliquerons soudainement un challenge d'hypercapnie durant 4 heures. Des paramètres indicateurs de stress seront mesurés au cours du temps. Ces mesures seront réalisées sur 8 bacs par lignée contenant chacun 40 poissons de 80g, afin d'obtenir une densité dans les bacs proche des conditions aquacoles (20kg/m<sup>3</sup>). Pour chacun des temps, nous mesurerons le cortisol dans l'eau ainsi que le comportement du groupe (répartition dans le bassin, vitesse de nage). Le challenge sera répété tous les jours pendant 5 jours afin de mesurer une potentielle acclimatation au challenge.

Cette étude nécessite un minimum de 8 bacs par lignée afin d'obtenir des résultats généralisables à l'ensemble de la population de la lignée. En diminuant le nombre de bacs, nous risquons d'obtenir des résultats qui ne divergent pas significativement par manque d'effectif.

Le nombre de poissons par bac doit permettre aux individus de l'aquarium d'adopter un réel comportement en groupe mais également d'obtenir une densité par bassin suffisamment importante pour mesurer des doses significatives de cortisol dans l'eau.

Il n'existe pas de méthodes alternatives pour cette étude qui nécessite de travailler *in vivo*.

771- Un accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain d'origine vasculaire. Les AVCs représentent la 3ème cause de mortalité dans les pays occidentaux et sont la 1ère cause de handicap acquis chez l'adulte. Ils sont classés en 2 catégories : les AVCs ischémiques (90 %) et les AVCs hémorragiques (10 %).

Notre projet est centré sur l'AVC ischémique, c'est-à-dire l'occlusion d'un vaisseau transportant le sang dans le cerveau. Le seul traitement administré après une ischémie cérébrale est la protéine thrombolytique tPA. Elle permet de restaurer la circulation sanguine dans le territoire touché et donc de réduire le handicap neurologique clinique. Seuls 2 à 5 % des patients peuvent bénéficier de ce traitement. Il est donc crucial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques neuroprotectrices pour traiter l'ischémie cérébrale.

Plusieurs études montrent qu'une activation aberrante de certains éléments régulateurs du cycle cellulaire dans les neurones, pourrait conduire à la mort cellulaire. Le but de notre projet est donc de mettre en évidence l'implication des mécanismes de réactivation du cycle cellulaire lors de l'ischémie cérébrale.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser deux modèles murins d'ischémie cérébrale :

- un modèle d'ischémie définitive par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) au chlorure de fer, réalisé chez 90 souris Swiss mâles

- un modèle d'ischémie transitoire par introduction d'un monofilament dans l'ACM, réalisé 120 souris C54BL/6J

Les deux modèles sont complémentaires puisque dans un cas l'occlusion de l'ACM est induite par des processus physiologiques et la formation du caillot est définitive ; Dans l'autre cas, l'occlusion de l'artère est mécanique, transitoire et permet de simuler une recirculation du flux sanguin cérébral.

Les études transcriptomiques réalisées in vivo nous ont déjà permis de sélectionner des éléments du cycle cellulaire activés chez la souris après ischémie. L'utilisation de ces deux modèles permettra de valider ces gènes candidats et leur régulation dans un modèle d'ischémie sévère permanent versus un modèle d'ischémie transitoire. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés et de remplacer le modèle, des inhibiteurs spécifiques des protéines candidates seront testés in vitro, à partir de modèles cellulaires d'hypoxie. Les inhibiteurs ayant des propriétés neuroprotectrices seront sélectionnés puis testés in vivo à partir de nos modèles murins. Si un effet neuroprotecteur est avéré in vitro et in vivo, l'inhibiteur spécifique du gène du cycle cellulaire pourra être considéré comme un traitement thérapeutique potentiel de l'ischémie cérébrale

772- L'inoculation à la souris est la technique de référence pour la culture du parasite *Toxoplasma gondii* (T. gondii) dans le diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Elle est effectuée en association avec la détection génomique de T. gondii par PCR, du fait de sa spécificité et de sa sensibilité.

La souris blanche Swiss femelle, exempte de toxoplasmose, est l'animal exclusivement utilisé pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale. Le protocole consiste en une inoculation par injection intra péritonéale d'un échantillon de liquide amniotique ou de placenta de patientes ayant contracté la toxoplasmose pendant la grossesse. Le nombre de souris inoculées est de 3 pour le liquide amniotique et de 6 pour le placenta.

Après un délai de 6 semaines, les souris inoculées font l'objet d'un prélèvement sanguin au niveau du sinus rétro-orbitaire afin de réaliser une sérologie de toxoplasmose sur leur sérum. En cas de positivité de la sérologie, la souris est euthanasiée et la recherche de kystes de T. gondii est effectuée sur son cerveau par observation microscopique.

La positivité de la sérologie, confirmée par l'observation de kystes de toxoplasmes, signe la présence du parasite T. gondii dans l'échantillon inoculé à la souris 6 semaines auparavant.

Les cerveaux de souris présentant des kystes de T. gondii sont transmis au Centre de Référence Biologique de la Toxoplasmose pour typage et analyse de sensibilité. Les souris dont la sérologie de toxoplasmose est négative sont euthanasiées par élongation cervicale.

773- Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet européen démarré en janvier 2012. Les objectifs généraux de ce projet sont de i) développer des aliments alternatifs durables adaptés aux besoins nutritionnels des espèces européennes de poissons d'élevage, tout au long de leurs cycles complets de vie, avec des niveaux réduits de farine de poisson (FM) et l'huile de poisson (FO) et ii) d'évaluer les conséquences physiologiques à long terme en développant des outils prédictifs applicables à de nombreuses espèces européennes de poissons d'élevage. L'objectif sera donc d'offrir une certaine souplesse dans l'utilisation des différents ingrédients pour la formulation d'aliments qui devront être peu coûteux, respectueux de l'environnement et qui assureront la production d'aliments de la mer de qualité et haute valeur nutritive.

Un des enjeux majeurs de la pisciculture est de pouvoir utiliser des aliments n'incorporant pas (ou peu) de farine et huile de poisson pour épargner les prélèvements effectués par la pêche. L'alternative consiste à utiliser des produits d'origine végétale, qui sont généralement riches en glucides et dépourvus en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGLPI).

Les poissons marins utilisent assez mal les sources de glucides et ne sont pas capables de synthétiser les acides gras polyinsaturés ; néanmoins, il a été montré chez certains vertébrés (volailles et mammifères) qu'il serait possible d'améliorer cette situation par un conditionnement nutritionnel (alimentation des animaux avec un aliment incorporant une forte teneur ou une faible teneur du nutriment pour lequel on souhaite une modification du métabolisme) des animaux durant les premières semaines de vie.

L'objectif de cette étude est donc de réaliser sur le bar (*Dicentrarchus labrax*) une expérience en 2 temps :

1er expérience : un conditionnement nutritionnel de 36000 larves de bar avec des aliments incorporant des teneurs élevées en glucides « HG », de faibles teneurs en AGLPI « LH », et un aliment témoin « T » (aliment breveté et commercialisé sous l'appellation Gemmamicro) (janvier –février 2014). Les poissons issus de cette expérience, seront regroupés en fonction de leur conditionnement, et nourris avec un même aliment commercial pendant 6 à 8 mois jusqu'à atteindre un poids d'environ 5-10g.

2ème expérience : Les 3 différents groupes expérimentaux (HG; LH; T) issus du conditionnement larvaire seront soumis à une expérience de nutrition en utilisant 1/ un aliment témoin (T2) et des aliments incorporant 2/ une forte teneur en glucides (HG2), 3/ une faible teneur en AGLPI (LH2) pour rechercher une possible amélioration des capacités métaboliques des poissons à utiliser un aliment riche en glucides et pauvre en AGLPI.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre de poissons mis en expérience a été calculé au minimum (Réduire) pour tenir compte de contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise pour ne pas induire de perturbations physiologiques et permettre une croissance et développement harmonieux des poissons (Raffiner). Des protocoles de sédation et anesthésie seront aussi pratiqués (Raffiner). Le remplacement n'est pas possible dans le cas d'un conditionnement alimentaire.

Le nombre de bacs utilisés et de poissons prélevés ont été déterminés au minimum tout en permettant une analyse statistique rigoureuse. L'estimation a été faite à partir de données de variabilités obtenues dans des expériences préalables (calcul de la puissance statistique).

774- Un sous-type de globules blancs, appelés les lymphocytes T, acteurs clés du système immunitaire, sont produits dans le thymus. Cet organe est constitué de deux régions anatomiques distinctes : le cortex et la médulla. Au sein de la médulla, les cellules épithéliales dites médullaires (CEM) jouent un rôle critique dans l'éducation des lymphocytes T. En effet, ces cellules préviennent l'apparition de pathologies autoimmunes telles que la sclérose en plaque ou le diabète de type I via leur capacité à détruire des cellules T potentiellement agressives envers nos propres tissus. Pour accomplir leurs fonctions, les CEM expriment de nombreux antigènes du soi qui sont présentés aux cellules T en cours de développement. Ces antigènes sont régulés par une molécule, située dans le noyau des CEM appelée, Aire. Le développement des cellules T est donc contrôlé par les CEM. De façon réciproque, le développement des CEM est contrôlé par un sous-type de cellules T, appelée CD4+. Bien que les interactions entre les CEM et les cellules T CD4+ jouent un rôle essentiel dans l'éducation des lymphocytes T, les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du développement des CEM restent mal caractérisés. Les objectifs de ce projet consisteront à caractériser (1) la nature de ces interactions cellulaires en terme d'affinité entre les CEM et les cellules T CD4+, (2) les voies de signalisation cellulaires induites par les cellules T CD4+ dans les CEM, (3) la régulation épigénétique du gène Aire au cours du développement des CEM. Pour répondre à ces questions, nous utiliserons des modèles de souris transgéniques chez lesquelles les CEM et les cellules T CD4+ n'interagissent pas (souris K14xpIII+pIV<sup>-/-</sup> et OT-IlxRag2<sup>-/-</sup>) ou interagissent avec des affinités distinctes (souris B3K506, RipmOVA:OT-IlxRag2<sup>-/-</sup> et souris sauvages C57BL6/J). Toutes les souris étant sur fond génétique pur C57BL6/J, le nombre d'animaux sera réduit puisque la variabilité interindividuelle est moindre. De plus, grâce aux avancées dans les protocoles de biologie moléculaire, le nombre de cellules et donc de souris nécessaires à l'aboutissement de ce projet seront réduits. Trois souris par groupe suffiront généralement par type d'expérience. Au total, un nombre de 291 souris sera utilisé pour faire aboutir ce projet. Concernant le raffinement, la souffrance sera minimale puisque nous ne feront appel qu'à du prélèvement d'organe (le thymus) après euthanasie ou à une injection intraveineuse d'antigène non toxique pour la souris. Ce projet ne pourra être effectué que dans un contexte in vivo car les CEM se différencient in vitro. Ce projet permettra donc de mieux caractériser les voies de signalisation menant à la génération de CEM matures, cellules critiques à la mise en place du système immunitaire.

775- Ce protocole a pour but de découvrir les facteurs moléculaires contrôlant la mise en place d'un cerveau fonctionnel. Il permettra en même temps d'étudier si ces facteurs contribuent aux déficits observés dans les maladies psychiatriques. Le bon fonctionnement du cerveau adulte nécessite la formation et le maintien de synapses fonctionnelles et spécifiques entre des types de neurones très variés. Cette organisation ne peut être reproduite par des systèmes cellulaires. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux pour pouvoir comprendre les mécanismes moléculaires permettant le développement du cerveau des mammifères et contribuant aux maladies psychiatriques.

Le modèle utilisé sera la souris *mus musculus*. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse in vivo de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines.

Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Nous prévoyons donc l'utilisation d'un total de 1000 souris sur 5 ans pour l'étude d'une vingtaine de facteurs moléculaires. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

776- Certains antiseptiques comme la Chlorhexidine sont indiqués en traitement local des infections buccales d'origine dentaire. L'emploi de ces antiseptiques se justifie par leur efficacité sur la flore bactérienne orale d'une part, et sur la nécessité de diminuer la consommation d'antibiotiques d'autre part.

Il a été démontré depuis plus de 20 ans que la Chlorhexidine est efficace in vitro sur les bactéries présentes dans des infections buccales odontogènes. On sait que les bisbiguanides (dont fait partie la Chlorhexidine) sont inhibés en présence de protéines. Qu'en est-il donc de l'efficacité de la Chlorhexidine en condition réelle, notamment en présence de matériel biologique riche en protéines comme le pus?

Des premiers éléments de réponse ont été apportés par des études proposant la mise en présence de Chlorhexidine avec de l'albumine sérique d'origine bovine ou des tissus nécrotiques pour simuler la présence d'éléments organiques, mais celles-ci ne tenaient pas compte de l'ensemble des propriétés physico-chimiques du pus.

Notre étude a donc pour objectif de déterminer si la présence de pus altère ou non l'efficacité de la Chlorhexidine, ce en mettant en présence le principe actif (la Chlorhexidine) et du pus stérilisé, sur des cultures bactériennes pathogènes en suspension communément retrouvées dans les infections orales (*Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides fragilis*). Un modèle animal de production de pus a ainsi été mis au point sur des rats de souche Wistar (le nombre de rats maximal utilisé a été évalué à 30) et fait l'objet de cette demande d'autorisation.

777- La nature de l'alimentation influence fortement les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits carnés des ruminants. Au-delà de ces critères de qualité, les récentes crises alimentaires en Europe ont aussi révélé un besoin d'authentification de l'alimentation des herbivores. Les consommateurs européens expriment des réticences face à l'intensification des conditions de production et ils ont une image positive des systèmes herbagers à faibles intrants, d'où l'intérêt de pouvoir authentifier les produits qui en sont issus.

Les recherches récentes montrent cependant un risque accru de défauts de qualités sensorielles en viande ovine produite dans les systèmes herbagers à faibles intrants : risque accru de défauts de flaveur/odeur de la viande probablement lié à une production accrue de scatole dans le rumen, et risque accru de défauts de fermeté du tissu adipeux de couverture en lien avec un rapport acides gras polyinsaturés/acides gras saturés plus élevé. Ces défauts sont probablement en lien avec une proportion accrue de légumineuses dans les prairies des systèmes à faibles intrants.

Cette expérimentation a pour but d'étudier la loi de réponse entre la proportion de légumineuses dans la ration de l'agneau et (i) les qualités sensorielles, notamment l'intensité des défauts de qualité sensorielle (flaveur/odeur de la viande et fermeté du tissu adipeux de couverture, ii) les qualités nutritionnelles de la viande, notamment la composition en acides gras de la viande et du tissu adipeux de couverture et iii) l'intensité de l'enrichissement de la viande en 15N, qui dépend de la proportion de légumineuses dans la ration et pourrait ainsi être un marqueur intéressant pour authentifier la viande issue de systèmes à faibles intrants.

Quatre lots de 9 agneaux mâles de race Romane seront élevés sur une prairie de dactyle entre le sevrage (à environ 2 mois) et l'abattage (à environ 6 mois) et chaque lot recevra tous les jours une quantité donnée de luzerne fraîchement coupée, qui représentera 0%, 25%, 50% et 75% de la ration. Les agneaux seront donc conduits en groupes de 9 animaux pendant toute la durée de l'expérimentation. Le dactyle sera offert à stade végétatif et en quantité suffisante pour permettre de couvrir l'ingestion volontaire des animaux. La luzerne sera distribuée pour moitié le matin et pour moitié l'après-midi pour éviter le risque de météorisation. Une prise de sang sera réalisée au sevrage, en cours d'expérimentation et à la fin de celle-ci, pour analyser les concentrations en scatole (composé responsable du défaut de flaveur de la viande), en pigments caroténoïdes (marqueurs de l'alimentation à l'herbe) et en testostérone (hormone sexuelle interagissant avec le scatole).

Le principe des 3R (remplacement, réduction, raffinement) est respecté : i) nous travaillons sur l'espèce cible (qu'il n'est donc pas possible de remplacer), ii) notre approche statistique préalable nous permet de limiter le nombre d'animaux expérimentaux et iii) les animaliers en charge de l'expérimentation sur le terrain sont expérimentés.

778- La maladie d'Alzheimer (MA) touche 60 millions de personnes dans le monde: la compréhension actuelle de son étiologie- initiation et progression- est encore fragile et ce faisant peu d'interventions ciblées- qu'elles soient thérapeutiques ou préventives sont disponibles. Toutefois, outre le recours à des molécules approuvées, le recours à l'imagerie du cortex de souris de laboratoire génétiquement modifiées pourrait contribuer à raffiner nos connaissances sur l'étiologie de la MA et à cribler des agonistes de récepteurs neuronaux.

Une protéine transmembranaire localisée au niveau des synapses des neurones peut être substrat de protéases ce qui se traduit par la génération de peptides beta amyloïdes qui s'agrègent autour des synapses. En résultent des plaques amyloïdes qui contribuent à la mort plus ou moins rapide ou lente des neurones.

Le but du projet est d'élucider les mécanismes de la transmission et de l'intégration synaptique dans les couches supérieures du cortex par des approches d'imagerie et par le recours à des agonistes des récepteurs de l'acétylcholine.

Bien que des systèmes in vitro permettent d'élucider certaines des étapes de la genèse des agrégats, il est essentiel de pouvoir étudier ces phénomènes sur le cerveau entier en utilisant des souris de laboratoire.

On prévoit l'utilisation de 225 souris transgéniques sur trois ans. Ce nombre a été réduit au minimum tout en permettant d'établir des conclusions statistiquement valides. Les animaux seront anesthésiés dès le début de la procédure qui est de courte durée, et jusqu'à leur euthanasie. Nous testerons au cours de ce projet l'effet de nouvelles molécules qui pourraient être utilisées aussi chez l'homme.

779- La fibrose est un processus pathologique complexe qui se caractérise par la formation excessive et persistante de tissu cicatriciel en réponse à une lésion chronique d'un tissu. Ce phénomène est l'élément central de très nombreuses pathologies chroniques affectant la plupart des organes dont les poumons. La Fibrose Pulmonaire Idiopathique (FPI) est une forme fréquente et sévère des pneumopathies diffuses. Elle évolue souvent vers une insuffisance respiratoire progressive avec une médiane de survie inférieure à 5 ans après diagnostic. Les mécanismes à l'origine de ce processus pathologique irréversible restent actuellement largement méconnus.

Face à l'échec des traitements actuels contre ce type de pathologies pulmonaires, il apparaît essentiel de développer de nouvelles pistes de traitement. Les microARNs (miRNAs) représentent une classe de molécules ayant un rôle clé dans la régulation de divers phénomènes cellulaires tels que le développement, la différenciation, la survie, la réponse au stress, l'apoptose ou la prolifération cellulaire. Bien qu'il y ait de plus en plus d'évidences au sujet de l'implication des miRNAs dans le processus de fibrose tissulaire, leur(s) rôle(s) précis demeurent encore largement inexplorés. Tout récemment, notre équipe a mis en évidence le rôle d'un miRNA particulier (miR-199-5p) dans le développement de la fibrose pulmonaire. Ces études menées *in vitro*, ont par ailleurs montré que ce miRNA agit de concert avec d'autres molécules (TGF $\beta$ , CAV-1) déjà connues pour être impliquées dans le développement des pathologies fibrotiques.

Le projet proposé a pour but de tester *in vivo* l'effet d'inhibiteur de molécules dites, "anti-miRs" sur le développement de la fibrose dans un modèle murin de FPI. Il s'attachera également à analyser les effets de cet inhibiteur à un niveau moléculaire *in vivo* afin de mieux comprendre l'ensemble des voies régulées par ce miRNA. Nous attendons de ces expériences pré-cliniques des enseignements essentiels sur les propriétés des anti-miRs permettant d'envisager leur emploi pour le traitement des patients atteints de pathologie pulmonaire fibrotiques.

780- Le neuroblastome est la tumeur extra-crânienne la plus fréquente chez l'enfant, qui se développe à partir du système nerveux sympathique. Soixante pour cent des enfants présentent des métastases dès le diagnostic. La présence de métastases est associée à un mauvais pronostic de la maladie, et moins de 30% des patients survivent au delà de cinq ans, malgré une thérapeutique agressive. Une meilleure connaissance de la biologie de cette tumeur complexe permettra de proposer de nouvelles approches thérapeutiques. L'angiogenèse joue un rôle capital dans la croissance et la progression tumorale et permet la formation de métastases. L'angiogenèse apparaît donc comme une cible intéressante dans la stratégie antitumorale. Des essais précliniques et cliniques ciblant les voies du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ont montré, dans divers types tumoraux, que les bénéfices de ces stratégies thérapeutiques sont transitoires et suivi d'une progression tumorale. Ce projet explore, par l'inhibition de l'angiogenèse dans des modèles de neuroblastome, différentes hypothèses pour expliquer l'échappement des tumeurs à ces thérapies. Nous avons évalué l'inhibition spécifique de VEGFR1-3 à l'aide de un inhibiteur spécifique VEGFR1-3 et la double inhibition de VEGFR2 et MET à l'aide du cabozantinib *in vitro*. L'inhibiteur spécifique VEGFR1 -3 a permis une inhibition de la prolifération (MTS) de différentes lignées de ainsi que le cabozantinib (VEGFR2, MET inhibition). Par ailleurs, nous avons obtenu un ralentissement de la migration cellulaire (test de la blessure) à l'C50 qui n'est pas observé en inhibant VEGFR seul. L'inhibition spécifique des récepteurs VEGFR1-3à 30mg/kg deux fois par jour pendant 28 jours, entraîne un retard significatif de la croissance tumorale sans régression dans le modèle sous cutané IGR-N91 chez les souris nude traitées comparé au contrôle.

Cet effet est également observé dans le modèle orthotopique (surrénale) IGRN91 Luc. Dans les deux modèles, une diminution significative de l'expression de CD34 en immunohistochimie traduit la réduction de la vascularisation tumorale sous traitement par un inhibiteur spécifique VEGFR 1-3. De plus, la réponse au traitement se traduit par une réduction du récepteur VEGFR1 et une diminution, de la phosphorylation d'AKT notamment dans les tumeurs réprimées. En parallèle, dans le modèle orthotopique, nous avons remarqué une augmentation du nombre d'individus présentant des métastases sous traitement par un inhibiteur spécifique VEGFR 1 -3 comparé aux contrôles. La présence de métastases était indépendante de la taille de la tumeur primitive.

En effet, nous avons détecté une activation des voies MET et SRC dans une majorité de tumeurs traitées pouvant traduire une augmentation de la capacité invasive des tumeurs traitées. De récentes études ont en effet montré que l'inhibition de la voie VEGFR pouvait entraîner sous l'effet de l'hypoxie l'activation de la voie MET pouvant expliquer ainsi une augmentation de l'agressivité de la tumeur. Ces expériences vont être complétées en explorant le rôle de MET et PDGFR dans l'échappement de l'inhibition de VEGFR à l'aide du cabozantinib et du regorafenib, en confirmant et explorant le phénomène métastatique induit par l'inhibition de VEGFR. L'objectif est de déterminer des facteurs supplémentaires qui pourraient être impliqués dans l'échappement aux traitements antiangiogéniques dans le but de suggérer des combinaisons thérapeutiques afin améliorer la survie des enfants atteints de neuroblastome.

781- Le contexte réglementaire européen actuel (Directive 96/23/EC) nécessite d'évaluer et de contrôler les résidus de produits de traitements vétérinaires dans les denrées d'origine animale.

Dans le cadre des activités de référence pour le contrôle des antibiotiques dans les matrices d'origine animale, il doit être fourni aux laboratoires de contrôle les méthodes de dépistage et de confirmation qui permettront la mise en place de plans de surveillance et ou de contrôle.

Ces méthodes sont aussi proposées aux laboratoires nationaux de référence des pays membres de l'union européenne.. Ce projet consiste donc à développer une méthode analytique adaptée au contrôle d'une famille d'antibiotiques très peu surveillée jusqu'alors par

Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de masse Tandem (CL-SM/SM). Or, l'utilisation de cette famille de molécules aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine entraîne un risque de transfert de résistance des bactéries à ces antibiotiques et l'usage en médecine vétérinaire doit être de ce fait contrôlé.

L'absorption orale de cette famille de molécules est pratiquement nulle et ces antibiotiques ne sont utilisables par voie orale que pour des indications digestives. En revanche, la résorption parentérale est rapide et complète. C'est pour le tissu rénal que ces antibiotiques présentent une très forte affinité et c'est donc vers cette matrice que s'orientera le

développement même si la matrice muscle sera également étudiée car des Limites Maximales en Résidus (LMR) ont été fixées pour cette dernière. Les LMR fixées pour le rein sont entre 2 à 25 fois plus élevées que pour le muscle selon l'aminoside en question.

L'objectif de ce projet qui a démarré en octobre 2012 est donc de développer et valider une méthode de confirmation des résidus à des concentrations le plus proche possible des limites réglementaires dans le rein et le muscle par CL-SM/SM (conformément à la décision 2002/657/EC). Afin d'évaluer l'efficacité de la méthode de confirmation sur des tissus naturellement chargés, une phase d'expérimentation animale est nécessaire et c'est donc cette dernière qui fait l'objet de la présente saisine déposée. Cette phase d'expérimentation animale ne pouvait être envisagée qu'après la mise au point préalable de la méthode analytique à partir d'échantillons supplémentés. L'antibiotique qui a été choisi pour cette vérification sur matrice chargée présente une difficulté supplémentaire par rapport aux autres membres de cette famille d'antibiotiques : le standard est composé d'un mélange de différentes formes et la LMR s'applique à la somme des différentes formes. La production de tissu chargé permettra donc de vérifier la performance de la méthode à extraire ce composé sur du tissu chargé et en même temps de vérifier les ratios entre les différentes formes et de comparer à un tissu supplémenté.

Les porcins représentent l'espèce la plus traitée en termes de tonnage par cette famille d'antibiotiques et est donc la matrice la plus indiquée pour cette étude. Trois porcs maximum seront traités. Ces porcs seront hébergés dans des box individuels et la procédure appliquée peut être considérée comme légère puisqu'il s'agit d'un traitement par injection puis abattage.

782- Les Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU) peuvent pénétrer en profondeur dans les tissus et permettent de réaliser des traitements en créant d'importantes lésions thermiques sans pour autant nécessiter un contact direct entre la sonde et le tissu à traiter.

Ce projet a pour but de développer un nouveau dispositif médical HIFU pour le traitement de la fibrillation atriale. A l'aide de ce dispositif, une nouvelle stratégie de traitement mini-invasive visant à isoler électriquement certaines régions cardiaques est expérimentée. Elle consiste à réaliser des lésions thermiques cardiaques par le biais d'un abord trans-oesophagien.

Après avoir validé cette nouvelle technique de traitement à l'aide de simulations numériques, d'expérimentations ex vivo et ex vivo/in situ, le projet d'expérimentation animale présenté consiste à valider la faisabilité du traitement sur l'animal in vivo. Cette étude en aigu s'articulera en 3 étapes successives et inclura 15 porcs maximum, c'est à dire 5 animaux maximum par étape.

783- L'objectif de ce projet est d'étudier les causes de la perte de la coordination des mouvements (ataxie) caractéristique du Syndrome d'Ataxie et de Tremblement lié au chromosome X Fragile (FXTAS). Avec 1 individu touché sur 3000, ce syndrome est la cause génétique la plus commune de tremblements et d'ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires). Le syndrome FXTAS est une maladie neurodégénérative d'origine génétique qui touche les hommes de plus de cinquante ans. Ce syndrome est particulièrement invalidant, en effet, les patients présentent à la fois une ataxie, des tremblements et une démence conduisant progressivement à une perte d'autonomie. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, celle-ci commence dans le cervelet, qui est le centre de la coordination des mouvements, puis s'étend à l'ensemble du cerveau. La compréhension de la fonction de ce gène muté nous permettra de mieux comprendre voire de traiter dans le futur ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car la perte de la coordination des mouvements ne peut pas être étudiée dans des modèles in vitro ou de culture cellulaire. De plus, la souris est un modèle d'ataxie déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris que nous développons présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique modèle de FXTAS. Nous espérons que ces animaux développeront les symptômes de tremblements et d'ataxie, voire de démence, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes à l'origine de cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver, enfin, une thérapie pour ce syndrome.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie (perte d'autonomie et donc incapacité des animaux à se déplacer et à s'alimenter) n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Enfin, pour éviter tout phénotype dommageable chez les animaux servant à établir et maintenir la lignée, nous utilisons une technique d'induction (CRE Tamoxifen) de la maladie conduisant à l'apparition d'un phénotype dommageable uniquement chez les animaux à étudier.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques.

En effet, des travaux précédents ont permis d'établir que l'étude de groupes de 6 animaux pour chaque temps d'analyse permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet un total de 56 animaux (28 souris

contrôles, 28 souris modèles de FXTAS) répartis sur quatre temps d'analyses (3, 6, 12 et 15 mois) sera testé lors des procédures expérimentales. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux prélevés pour éviter un doublon des procédures expérimentales.

784- L'objectif de ce projet est d'étudier la faiblesse musculaire caractéristique des Dystrophies Myotoniques (DM). Avec 1 individu touché sur 8000, ces maladies sont les myopathies les plus fréquentes chez l'adulte. De plus, les Dystrophies Myotoniques sont particulièrement invalidantes, en effet, les patients présentent à la fois une myotonie (difficulté à relâcher un muscle contracté), des troubles de la conduction cardiaques, une faiblesse musculaire conduisant progressivement à la perte de la locomotion puis à la mort, due à un affaiblissement fatale des muscles respiratoires. Ces maladies sont dues à une anomalie de l'expression de l'ADN qui entraîne des altérations des muscles squelettiques. La compréhension de l'expression de ce gène muté nous permettra de mieux comprendre voire de traiter dans le futur ce type de myopathies chez l'Homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes musculaires de ces maladies. De plus, la souris est un modèle de myopathies déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris développé présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique. Nous espérons que ces animaux développeront les symptômes de la maladie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes provoquant cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver, enfin, une thérapie pour ces maladies.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie (affaiblissement des muscles conduisant à une détresse respiratoire et une mort lente des patients) n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques.

En effet, nos précédentes études ont permis d'établir que l'étude de groupes de 6 animaux pour chaque temps d'analyse permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet un total de 84 animaux (28 souris contrôles, 28 souris modèles de la Dystrophie Myotonique de type 1, et 28 souris modèles de la Dystrophie Myotonique de type 2) répartis sur quatre temps d'analyses (1, 3, 6 et 12 mois) sera testé lors des procédures expérimentales. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les muscles prélevés pour éviter un doublon des procédures expérimentales.

785- L'objectif de ce projet est d'étudier l'altération de la locomotion caractéristique de la démence fronto-temporale et de la sclérose latérale amyotrophique associées au chromosome 9 (c9orf72 ALS-FTD). Cette maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide est caractérisée par une démence et une paralysie progressive conduisant à la mort des patients. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurons de la moelle épinière, qui sont responsables des mouvements. La compréhension de la fonction de ce gène muté nous permettra de mieux comprendre, voire de traiter, ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de paralysie moteur déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris que nous développons présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique modèle de cette maladie. Nous espérons que ces animaux développeront une paralysie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes à l'origine de cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver une thérapie pour cette maladie.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Enfin, pour éviter tout phénotype dommageable chez les animaux servant à établir et maintenir la lignée, nous utilisons une technique d'induction (CRE Tamoxifen) de la maladie conduisant à l'apparition d'un phénotype dommageable uniquement chez les animaux à étudier.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir que l'étude de groupes de 6 animaux pour chaque temps d'analyse permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet un total de 56 animaux (28 souris contrôles, 28 souris modèles d'ALS-FTD) répartis sur quatre temps d'analyses (3, 6, 12 et 15 mois) sera testé lors des procédures expérimentales. De plus, un

maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

786- L'objectif de ce projet est d'étudier l'altération de la coordination des mouvements (ataxie) caractéristique de l'Ataxie Spinocérébelleuse de type 31 (SCA31). Cette ataxie est la troisième cause génétique la plus fréquente d'ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires) au Japon. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cervelet, qui est le centre de régulation de la coordination des mouvements. La compréhension de la fonction de ce gène muté nous permettra de mieux comprendre, voire de traiter, ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle in vitro ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de perte de coordination des mouvements typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle d'ataxie déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris que nous développons présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique modèle de SCA31. Nous espérons que ces animaux développeront une ataxie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes à l'origine de cette maladie, et (2) de tester des médicaments afin de trouver une thérapie pour cette maladie.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront sacrifiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Enfin, pour éviter tout phénotype dommageable chez les animaux servant à établir et maintenir la lignée, nous utilisons une technique d'induction (CRE Tamoxifen) de la maladie conduisant à l'apparition d'un phénotype dommageable uniquement chez les animaux à étudier.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir que l'étude de groupes de 6 animaux pour chaque temps d'analyse permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet un total de 56 animaux (28 souris contrôles, 28 souris modèles de SCA31) répartis sur quatre temps d'analyses (3, 6, 12 et 15 mois) sera testé lors des procédures expérimentales. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux prélevés pour éviter un doublon des procédures expérimentales.

787- Les troubles du comportement alimentaire représentent un problème de santé publique croissant dans notre société. L'étude des mécanismes biologiques à la base de la régulation de la prise alimentaire, et plus largement du métabolisme énergétique devrait permettre de mieux appréhender ces troubles et de déterminer de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique. Nos études visent à comprendre comment des variations de concentration en nutriments (glucose, acide gras, ...) sont perçues par le système nerveux central et dans quelle mesure ce mécanisme participe au contrôle du métabolisme énergétique.

Nous planifions ainsi d'étudier des neurones particuliers présents dans l'hypothalamus qui ont la capacité de modifier leur activité électrique en réponse à des variations de niveau de glucose. L'étude de ces neurones dits gluco-sensibles permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique.

Nous recherchons spécifiquement quelle est la nature du canal ionique mis en jeu dans la réponse des neurones excités par le glucose de type HGE (high-glucose excited) et son implication dans la régulation du comportement alimentaire et de l'homéostasie glucidique (sécrétion d'insuline, production hépatique de glucose). Au vu de leurs propriétés, les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) sont des candidats privilégiés. Nous déterminerons également si les espèces actives de l'oxygène (EAOs) sont impliquées dans la sensibilité au glucose des neurones HGE.

Les travaux de recherche que nous mènerons visent à répondre aux questions suivantes:

1. Quel sous-type de canal TRP est impliqué dans la sensibilité au glucose des neurones HGE?
2. Les EAOs sont-elles nécessaires à la sensibilité au glucose des neurones HGE ?
3. Les neurones HGE sont-ils impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (régulation du comportement alimentaire, de la sécrétion d'insuline, de la production hépatique de glucose)?

Pour cela, la combinaison de stratégies d'imagerie cellulaire, de biologie moléculaire et d'expérimentation animale in vivo sera utilisée sur 514 rats et 366 souris sur une période de 4 ans. L'étude de métabolisme énergétique et plus particulièrement du comportement alimentaire ne peut être réalisée que sur animaux vivants ce qui rend impossible le remplacement de ceux-ci par des modèles in vitro. De même l'étude des neurones gluco-sensibles nécessite l'utilisation de cultures primaires de neurones car aucun modèle de lignée cellulaire fiable permettant l'étude de ces neurones n'existe. Le nombre d'animaux sera réduit au mieux grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux (habituation, utilisation d'anesthésique et antalgique).

788- Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones pléiotropes régulant à la fois le système immunitaire, la réponse au stress et le métabolisme énergétique. Notre groupe s'intéresse au rôle joué par les GC sur les cellules beta pancréatiques dont la principale fonction est de sécréter l'insuline, seule hormone hypoglycémisante. Pour aborder ce rôle, nous mettons en place et étudions des modèles de souris dont l'expression de protéines impliquées dans la signalisation des GC (récepteur des GC ou GR, co-régulateur du GR PGC-1alpha) est invalidée ou forcée de façon spécifique dans les cellules beta pancréatiques. Nous mesurons alors les conséquences de ces modifications sur la fonction des cellules beta et les répercussions que cela entraîne sur la régulation de l'homéostasie glucidique sur l'organisme entier. Ce projet prévoit d'utiliser 414 animaux. Cet effectif est nécessaire pour obtenir des résultats homogènes lors de tests métaboliques pratiqués dans ce projet. Notre projet vise à définir les conséquences de la modification de la signalisation des glucocorticoïdes uniquement dans les cellules beta pancréatiques sur l'organisme entier et sur la régulation de l'homéostasie glucidique. C'est un travail de physiologie intégrée qui permettra de comprendre les communications inter-organes et les régulations métaboliques entre les cellules qui produisent l'insuline et celles qui y répondent. Pour ces raisons, nous avons choisi de travailler chez la souris, organisme dans lequel nous pouvons introduire des modifications géniques spécifiquement dans les cellules beta pancréatiques et chez qui nous pouvons ensuite explorer les conséquences métaboliques. Aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire ces interactions inter-organes. Nos expériences requièrent 6 animaux par groupe afin de pouvoir observer des changements phénotypiques de 20%.

Le bien-être des animaux est au cœur de nos préoccupations. Ainsi, des protocoles d'enrichissement de l'environnement de l'animal sont mis en place avec notamment la présence de nids végétaux et de tunnels. De plus, nous avons inclus dans certains protocoles des grilles de suivi de poids des animaux, avec une pesée hebdomadaire, voire bihebdomadaire, afin de déceler une perte de poids, qui serait signe d'une souffrance de l'animal. Nous avons fixé comme point limite une perte de poids de 10-15% du poids initial, qui entraînerait le sacrifice de l'animal.

Notre projet comporte aussi un volet impliquant des animaux génétiquement modifiés. Une attention très particulière sera portée à ces animaux afin de déceler tout comportement anormal.

Enfin, le sacrifice des animaux sera réalisé sur des animaux préalablement anesthésiés.

#### **789- Nanomédecine : Application en cancérologie pour accroître la dose d'énergie létale dans des cellules cancéreuses**

Les nanosciences et les nanotechnologies recouvrent l'ensemble des activités scientifiques et technologiques intervenant à l'échelle nanométrique. Elles font référence à la compréhension de phénomènes et à la fabrication d'objets nanoparticulaires qui ont une taille à l'échelle du nanomètre (nm), soit 10-9m.

La nanomédecine est l'exploitation des nanotechnologies pour le développement d'applications de rupture dans le domaine de la santé humaine<sup>1</sup>. Ces applications sont possibles grâce à l'exploitation des propriétés physiques, chimiques et biologiques des matériaux à l'échelle nanométrique et autorisent ainsi des approches novatrices.

##### **Nouvelle modalité de traitement des tumeurs solides**

Les nanoparticules « nanoXray » proposées dans le cadre de ce projet sont des nanoparticules inertes conçues pour absorber spécifiquement les rayons X utilisés en radiothérapie. Lors de leur exposition aux radiations ionisantes, elles s'activent et libèrent une quantité très importante d'énergie à l'intérieur des cellules tumorales, provoquant la formation de radicaux libres qui détruisent les cellules cancéreuses. Les nanoparticules NBTX IV 10 représentent la forme administrable par injection intraveineuse des nanoparticules « nanoXray ».

##### **Objectifs**

Cette étude a pour objectif l'évaluation de la toxicité aiguë, la tolérance et la faisabilité des injections intraveineuses répétées des nanoparticules NBTX IV 10 chez la souris. Cette évaluation constitue un aspect crucial pour l'utilisation ultérieure des nanoparticules chez l'Homme.

La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeurs humaines xénotransplantées chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux à travers toute la recherche en oncologie. Il est choisi par la société pour l'évaluation de l'efficacité anti-tumorale de ses produits. Aussi, l'évaluation de la toxicité aiguë du produit NBTX IV 10 chez la souris est un pré-requis nécessaire aux études d'évaluation d'efficacité anti-tumorale.

Il est à noter que durant cette étude les nanoparticules ne seront pas activées par la radiothérapie et que donc seule la toxicité aiguë, la tolérance et la faisabilité des injections répétées des nanoparticules à l'état inerte seront évaluées.

Cette étude sera réalisée sur des souris OF1 réparties en 3 groupes de 7 animaux chacun : un groupe control, un groupe Q1D5 et un groupe Q2D3.

En l'absence de données toxicologiques sur ce produit un suivi quotidien des animaux sera réalisé (suivi de poids, comportement et état général des animaux). En cas de dégradation de l'état général d'un animal ou de toute anomalie survenant lors de l'étude, les mesures appropriées seront mise en œuvre pour y répondre.

790- En médecine, les nanoparticules montrent un potentiel grandissant pour traiter certaines pathologies ou certains cancers.

Certains traitements anticancéreux s'appuient sur le chauffage localisé de la tumeur à l'aide de nanoparticules magnétiques. L'application d'un champ magnétique sur la zone tumorale permet un chauffage localisé par hyperthermie magnétique et une destruction partielle, voire complète, de la tumeur. Aujourd'hui, ce type de technologie est en plein

essor et certains traitements sont actuellement testés dans le cadre d'essais cliniques. Par exemple, une société a obtenu des résultats très prometteurs sur le traitement du glioblastome sur des patients (âgés de 18 à 75 ans) souffrant de glioblastomes. Le traitement appliqué a permis d'augmenter significativement le temps de vie des patients. D'autre part, leurs études ont pu démontrer la faisabilité clinique de la nouvelle procédure, son excellente tolérance, et la possibilité d'atteindre des températures comprises entre 43 °C et 50 °C dans des tumeurs ayant un diamètre d'environ (~6 cm).

Au laboratoire, nous développons un traitement innovant reposant sur l'hyperthermie magnétique à base de nanoparticules d'origines biologiques. Ces nanoparticules biologiques sont potentiellement plus efficaces que les particules synthétisées par voie chimique pour traiter certains cancers par hyperthermie, car elles répondent plus efficacement au champ magnétique. Nous avons récemment montré l'efficacité de ces particules dans le traitement de tumeurs mammaires humaines implantées chez la souris. L'objectif du présent projet cherche à mieux délimiter les conditions d'efficacité de notre traitement anticancéreux sur le modèle de la souris, ce dernier constitue un modèle de choix pour des études in vivo en raison des outils d'analyses disponibles. En effet, la plupart des analyses ne peuvent pas être reproduites in vitro ni ex vivo, ce qui nécessite l'utilisation des modèles murins adultes. Dans ce projet, nous chercherons à établir quelles sont les conditions d'utilisation optimales du traitement par ces nanoparticules en terme d'efficacité anti-tumorale tout en caractérisant certains aspects essentiels (toxicité, distribution et élimination des nanoparticules) pour le passage en phase clinique. Ce projet d'inscrit dans le respect de la règle des « 3 R » (remplacer, raffiner et réduire). Le nombre de souris utilisé pour ces études a été défini de manière optimale pour permettre de mener à bien ce projet. Des points limites sont également pris en compte pour permettre la meilleure adéquation entre l'obtention des informations et le respect de la souffrance animale.

791- L'équipe travaille sur des transporteurs de neurotransmetteurs importants pour les comportements liés à l'humeur et des troubles psychiatriques comme la dépression et les psychoses. Les expériences chez des souris mutées (knock-out) pour le transporteur OCT2 vont permettre de comprendre le mécanisme d'action de certains médicaments (antidépresseurs, antipsychotiques) utilisés chez l'homme et potentiellement identifier de nouveaux agents thérapeutiques. En particulier, le projet vise à caractériser le rôle d'OCT2 dans la réponse aux antidépresseurs dans un modèle de dépression chronique chez la souris, avec pour objectifs i) de déterminer si OCT2 est impliqué dans l'efficacité de certains antidépresseurs classiques et ii) de définir la contribution de différents processus biologiques à la potentialisation de la réponse aux antidépresseurs par OCT2. Une autre partie du projet se propose de développer de nouveaux ligands spécifiques des OCTs afin de moduler leur activité in vivo chez l'animal, en vue d'améliorer l'efficacité des antidépresseurs dans notre modèle préclinique. L'action à court terme ou long terme de ces diverses molécules psychoactives ne peut être évaluée de manière définitive qu'in vivo sur animal entier pour rester le plus conforme aux conditions de leur administration chez l'homme. Dans le cadre du raffinement de l'expérimentation animale, les protocoles utilisés (chirurgie, NSF) ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur possible. Bien que l'on essaie de minimiser le nombre d'animaux, des groupes de 10 souris minimum doivent être utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement concluants. La plupart du temps, les mêmes animaux seront soumis séquentiellement à des batteries de tests comportementaux pertinents entrecoupés de périodes de repos, afin d'en limiter le nombre. A terme, ils seront utilisés pour les analyses moléculaires et biochimiques. On évalue le nombre d'animaux sur 5 ans à 460 souris (wild-type ou knock-out).

792- PMAT/ENT4 est un transporteur atypique récemment découvert et potentiellement également impliqué dans le transport des neurotransmetteurs aminergiques dans le cerveau. Pour explorer sa fonction, la recombinaison sélective de PMAT sera réalisée en croisant des souris comportant un allèle floxé du gène PMAT (Slc29a4 ; appelé encore ENT4) avec une lignée exprimant la recombinaison Cre dans les neurones cholinergiques ou encore par injection stéréotaxique de virus AAV exprimant cette recombinaison. On déterminera son rôle 1) dans les neurones cholinergiques du cerveau antérieur et son implication dans les processus cognitifs, 2) dans les interneurons cholinergiques du striatum et la locomotion et les processus de récompense et 3) dans le noyau du raphe dans le contrôle de l'anxiété, du stress et les comportements sociaux. Les modèles de souris knock-out pour le transporteur étudié (PMAT) permettent d'étudier la fonction de celui-ci in vivo chez l'animal, ce qui ne peut pas être réalisé en tube à essai ou en culture. L'étude chez l'animal est donc irremplaçable en complément des autres approches pour aborder les mécanismes complexes qui sous-tendent des pathologies comme les maladies psychiatriques ou l'addiction. De même, l'action à court terme ou long terme de drogues ou médicaments ne peut être évaluée de manière définitive qu'in vivo sur animal entier pour rester le plus conforme aux conditions d'administration de ces médicaments chez l'homme. Dans le cadre du raffinement de l'expérimentation animale, les protocoles utilisés (chirurgie, NSF, confrontation résident-intrus) ont été optimisés pour exposer les animaux au minimum de douleur possible. Bien que l'on essaie de minimiser le nombre d'animaux, des groupes de 10 souris minimum doivent être utilisés afin d'obtenir des résultats statistiquement concluants. La plupart du temps, les mêmes animaux seront soumis séquentiellement à des batteries de tests comportementaux pertinents entrecoupés de périodes de repos, afin d'en limiter le nombre. A terme, ils seront utilisés pour les analyses moléculaires et biochimiques. On évalue le nombre d'animaux sur 5 ans à 600 souris (wild-type ou knock-out).

793- La schizophrénie est un trouble psychiatrique dont les causes sont génétiques et environnementales. Un des symptômes physiologiques est une modification de la concentration de dopamine dans le cerveau. Parmi les origines génétiques, des altérations du gène *GluRdelta1* ont été observées. Ce gène est notamment présent dans les neurones qui sécrètent de la dopamine dans le cerveau. La protéine issue de ce gène est un récepteur exprimé à la surface des neurones et dont la molécule activatrice naturelle est inconnue. Cependant il a été montré qu'il pouvait s'associer avec la protéine *mGluR1*, un récepteur au glutamate, un neurotransmetteur excitateur dans le cerveau. Notre objectif est de comprendre comment le couplage avec *mGluR1* intervient dans la connexion entre les neurones libérant le glutamate et les neurones à dopamine et comment la protéine *GluRdelta1* régule l'activité des neurones à dopamine et donc contribue au maintien d'un niveau adéquate de dopamine dans le cerveau.

Dans le cadre de ce projet scientifique, des expériences seront réalisées en culture cellulaire sur des lignées immortalisées non neuronales pour examiner le couplage entre *mGluR1* et *GluRdelta1* par application de molécules activant *mGluR1*. Ceci permettra d'examiner l'effet de l'interaction *mGluR1-GluRdelta1* dans un modèle cellulaire simple. Cependant des expériences d'électrophysiologie sur les neurones libérant la dopamine seront nécessaires sur des tranches de cerveau de souris afin de tester le rôle de *GluRdelta1* dans la communication entre neurones. Il n'est pas possible de réaliser ces expériences sur des cellules en culture car il est nécessaire de conserver la connectivité avec les neurones voisins. De plus les neurones à dopamine sont peu nombreux dans le cerveau et ne peuvent pas être mis en culture. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas le gène *GluRdelta1*. Ceci permettra d'étudier le rôle de cette protéine en comparaison avec les animaux non modifiés. L'utilisation de virus permettant d'exprimer efficacement des mutants de *GluRdelta1* et permettra d'affiner les connaissances sur les relations entre la structure et les fonctions de cette protéine. Ce projet utilisera 90 souris génétiquement modifiées pour le gène *GluRdelta1* et 80 souris non modifiées soit 170 animaux sur trois. L'élevage des souris en animalerie sera optimisé pour réduire le recours à des souris venant d'élevages extérieurs et minimiser les animaux non utilisés.

794- Les neuropeptides RF-amides, kisspeptine et RFRP3, régulent l'axe reproducteur des mammifères. Notre équipe étudie la régulation de l'activité de reproduction chez le hamster syrien mâle, un rongeur saisonnier (c'est-à-dire qu'il est sexuellement actif en photopériode longue et inactif en photopériode courte). Récemment nous avons montré que 1) l'expression de ces deux neuropeptides est diminuée en photopériode courte et 2) que la diminution des kisspeptine et RFRP3 en photopériode courte entraîne une inhibition de l'activité de reproduction.

Les études sur la reproduction des mammifères, et en particulier les rongeurs, femelles sont beaucoup plus rares que celles réalisées chez les mâles. Ceci est probablement lié aux différentes contraintes temporelles existant dans la reproduction femelle (moment du jour, stade du cycle reproducteur, saison). Pourtant des études préliminaires de notre équipe indiquent que les mécanismes d'action des neuropeptides kisspeptine et RFRP3 présentent des différences selon le sexe des animaux. Par exemple le RFRP3 stimule la sécrétion de l'hormone lutéinisante (LH) chez le mâle mais pas chez la femelle.

Le but de ce projet est d'analyser les effets d'injections centrales (intracérébroventriculaires) du kisspeptine ou du RFRP-3 sur l'activité de reproduction (activité des neurones à GnRH, sécrétions hormonales, rythme oestrien, développement des gonades) chez des hamsters syriens femelles. Les peptides sont administrés par voie intra-cérébro-ventriculaire car ce sont des peptides hypothalamiques qui agissent dans le système nerveux central. Nous testerons l'effet d'injections aiguës (procédure 1) ou chroniques (procédure 2) sur des hamsters syriens femelles maintenues soit en photopériode longue activatrice, soit en photopériode courte inhibitrice. L'injection aiguë permettra de déterminer les effets per se des peptides à deux moments du cycle oestrien (proestrus et diestrus où les sécrétions hormonales sont différentes); l'injection chronique permettra d'évaluer si les peptides sont capable de réactiver l'ensemble de l'axe reproducteur quand les animaux sont en photopériode courte inhibitrice.

Pour réaliser ce projet nous aurons besoin de 320 hamsters syriens femelles adultes (192 pour la procédure 1 ; 128 pour la procédure 2).

Pour la procédure 1 : nous effectuerons des injections aiguës de 2 peptides (kisspeptine ou RFRP3) à 3 doses (0, 1 et 5 nmole/injection ; doses estimées en fonction de nos résultats obtenus précédemment chez le hamster mâle) chez des femelles soit en proestrus, soit en diestrus. Pour un peptide testé il y aura 6 groupes (3 doses x 2 états oestriens) ; et donc pour les 2 peptides 12 groupes. L'ensemble de la procédure sera dupliqué pour valider les résultats obtenus. Il y aura donc un total de  $2 \times 12 (=24)$  groupes. Chaque groupe comprend 8 hamsters femelles, soit un total de  $24 \times 8 = 192$  animaux.

Pour la procédure 2 : nous effectuerons des infusions chroniques (5 semaines) de 2 peptides (kisspeptine ou RFRP3) délivrés à 3 doses (0, 1 ou 10 nmole/jour ; doses estimées en fonction de nos résultats obtenus précédemment chez le hamster mâle) chez des femelles maintenues en photopériode courte inhibitrice et les résultats obtenus sur l'activité reproductrice seront comparés à ceux de femelles maintenues en photopériode longue activatrice. Pour un peptide testé, il y aura 4 groupes (1 groupe en photopériode longue (contrôle) ; 3 groupes en photopériode courte recevant trois doses de peptides (0, 1 et 10 nmole/jour)) ; et donc pour les 2 peptides 8 groupes. L'ensemble de la procédure sera dupliqué pour valider les résultats obtenus. Il y aura donc un total de  $2 \times 8 = 16$  groupes. Chaque groupe comprend 8 hamsters femelles, soit un total de  $16 \times 8 = 128$  animaux.

Le nombre d'animaux par groupe est établi à 8, minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement valides, étant donné les variations inter-individuelles attendues et la possibilité d'une mauvaise implantation de canules intracérébrales.

Ce projet nécessite une approche invasive (pose de canules intracérébroventriculaires sur plusieurs jours) mais il doit être réalisé sur l'animal entier car l'axe reproducteur est complexe incluant l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades. Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésique, suivi du score de douleur) et dans le cas d'un niveau de douleur trop élevé, l'expérience sera arrêtée et l'animal euthanasié.

795- Les patients en réanimation, victimes d'une infection majeure et/ou d'un traumatisme (traumatisme crânien par exemple), présentent une perte majeure de masse musculaire, caractéristique des situations hypercataboliques et qui conditionne leur pronostic. La prévention de cette fonte musculaire est donc un objectif thérapeutique prioritaire.

Certains acides aminés (AA) pourraient permettre de préserver la masse musculaire et leur apport pourrait être bénéfique dans ces circonstances. Compte-tenu des différences de mécanisme de la perte musculaire entre infection et traumatisme, l'efficacité des approches thérapeutiques à l'aide d'AA pourrait toutefois dépendre de la situation clinique.

La citrulline (Cit) est un AA capable de restaurer la masse musculaire chez le rat âgé dénutri. Une complémentation en Cit pourrait être efficace dans les situations hypercataboliques (infection généralisée, trauma, inflammation sévère...). Cependant, cela n'a jamais été vérifié expérimentalement et l'essai direct chez l'homme paraît dangereux. En effet, certaines études cliniques, réalisées sans essais précliniques préalables, ont montré une augmentation de la mortalité en réanimation avec certains AA chez des patients pluri-pathologiques (infection généralisée avec défaillance d'organes).

Notre projet vise ainsi à évaluer l'intérêt d'une complémentation en Cit sur le maintien de la masse musculaire (équilibre entre la synthèse et le catabolisme protéique) dans différents modèles reproduisant l'infection, le traumatisme, ou l'infection en situation de traumatisme et donc les différents processus de perte musculaire en situation d'agression (simple diminution des synthèses protéiques musculaires, augmentation de la dégradation ou combinaison des deux).

Les modèles retenus sont l'endotoxémie par injection de lipopolysaccharide (LPS) d'E. coli, le traumatisme crânien (TC), et le TC avec surinfection par E. coli. L'injection de LPS reproduit les principales manifestations métaboliques de l'infection et il n'existe pas de modèle validé d'infection par simple administration d'E. coli dans l'estomac. Le TC est largement validé comme modèle de traumatisme grave. Par ailleurs, le TC engendre des atteintes intestinales favorisant la surinfection bactérienne, reproduite dans notre modèle par l'administration dans l'estomac d'E. Coli (ce que ne ferait pas une administration orale de LPS).

Nous testerons ainsi l'effet d'une complémentation en Cit dans ces différents modèles. Ces situations cliniques étant associées à une incapacité à se nourrir et donc obligeant la réalisation d'une nutrition artificielle, la Cit sera apportée par voie digestive dans un mélange de nutrition entérale délivré en continu grâce à un cathéter dans l'estomac.

Nous étudierons en parallèle 7 groupes de 8 animaux : un groupe contrôle sain et 6 groupes soumis à l'une des 3 situations d'agression avec ou sans complémentation en Cit. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est donc de 56 rats. Il s'agit là de l'effectif minimum nécessaire compte tenu de la variabilité des paramètres étudiés telle que nous avons pu l'évaluer dans des études précédentes utilisant ces modèles.

Enfin, notre projet sera complété par une partie in vitro (sur cellules musculaires en culture) qui vise à explorer plus en profondeur des paramètres mécanistiques sans avoir recours à un modèle animal.

796- La dégradation des performances de reproduction en élevage bovins laitiers est une tendance connue par tous et qui peut être associée à l'agrandissement des cheptels, l'évolution du métier d'éleveur mais également par la biologie des vaches elle-même, devenues moins fertiles. Les échecs de gestation ont majoritairement (~75%) lieu au cours des étapes précoces de la reproduction allant de l'ovulation à l'implantation de l'embryon en passant par la fécondation et les premières étapes de développement embryonnaires. Ces premières étapes constituent une « boîte noire » physiologique qui doit être décortiquée pour comprendre les mécanismes régulant ces étapes clés et ainsi améliorer les performances de reproduction en élevage. Ce projet a pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes régulant les premières étapes de la reproduction en s'intéressant exclusivement à cette période clé (environnement follicule/ovocyte, oviducte/embryon, utérus/embryon). Ce projet comprend un modèle animal visant à étudier l'expression des gènes dans différents échantillons biologiques collectés sur des populations extrêmes d'un point de vue prédiction génétique de leur aptitude à se reproduire. Ainsi, 3 lots de 15 génisses seront utilisés dans ce projet : des génisses de race Holstein dites « ferti+ » (bonnes aptitudes à la reproduction), des génisses de race Holstein dites « ferti- » (mauvaises aptitudes à la reproduction) et des génisses de race Montbéliarde dites « ferti++ » connues pour leur très bonne fertilité. De fait, le modèle animal ne peut, compte-tenu des objectifs, être substitué par un modèle d'étude in vitro mais le nombre d'individus a ici été déterminé en fonction des besoins en termes d'analyse d'expression des gènes dans les échantillons collectés. Une attention particulière sera portée aux animaux expérimentaux dès leur introduction dans les installations expérimentales jusqu'à leur abattage en fin de programme pour la collecte des derniers échantillons biologiques (prise en charge de la douleur et du stress, enrichissement du milieu). A la fin du projet, la connaissance des gènes différentiellement régulés entre les « bonnes » et les « mauvaises » reproductrices permettra une meilleure compréhension des mécanismes régulant les premières étapes de reproduction, de nouveaux phénotypes de la fertilité seront identifiés pour une application directement en élevages (biomarqueurs précoces prédictifs de la réussite à l'insémination par exemple) ou indirectement via leur intégration dans les schémas de sélection (sélection de femelles produisant des ovocytes de meilleure qualité, sélection de femelles présentant le meilleur environnement maternel...) et l'efficacité des

biotechnologies de la reproduction pourra être optimisée (amélioration notamment de la qualité de l'embryon produit in vitro de plus en plus utilisé de nos jours dans la diffusion du progrès génétique).

797- L'objectif de notre projet est de démontrer que la lumière exerce un effet bénéfique sur l'humeur par une action directe non circadienne via les cellules ganglionnaires à mélanopsine de la rétine et leurs projections vers les centres supérieurs du cerveau. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes neurophysiologiques qui sous-tendent les phénomènes de dépression saisonnière observée chez l'homme, l'effet positif de la luminothérapie et de la privation de sommeil (effet sur l'homéostat et antidépresseur) sur les pathologies de dépression.

Grâce à un modèle de souris ne produisant pas la mélanopsine et donc ne transmettant pas l'information lumineuse non visuelle au cerveau, nous pourrions évaluer l'effet spécifique de cette intégration d'information sur le comportement en comparant des animaux dépourvus de mélanopsine (Opn4<sup>-/-</sup>) et des animaux contrôles (Opn4<sup>+/+</sup>) sous différentes conditions et intensités lumineuses.

Sachant que chez l'homme la dépression saisonnière est réversible, nous souhaitons également vérifier cette réversibilité.

Respect du principe des 3 R : Les informations lumineuses sont transmises au reste de l'organisme via la rétine. Les expériences ne peuvent donc être réalisées que sur animal entier (approches in vivo).

Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique interindividuelle un effectif total pour l'ensemble des expériences consacrées à la validation neurobiologique, neurophysiologique et pharmacologique de notre hypothèse souhaitant démontrer que la lumière exerce un effet sur l'humeur par une action directe non circadienne d'au moins 210 souris mâles adultes (2 génotypes confondus) sera nécessaire. Nous n'utiliserons pas de femelles car cela rajouterait un facteur de variabilité supplémentaire et cela nécessiterait de contrôler le cycle hormonal.

Cette validation nécessite 7 procédures expérimentales, mais 4 d'entre elles (les tests comportementaux et la réversion pharmacologique) font partie d'un enchaînement de procédures qui utilisent un même groupe d'animaux dans des conditions lumineuses différentes pour éviter d'utiliser un nombre excessif et inutile d'animaux.

798- Les fausses couches à répétition affectent 1 à 3% des grossesses humaines, et leur déterminisme génétique est très mal connu. L'utilisation d'un modèle murin hybride entre une souris de laboratoire et une souris sauvage a permis en 2009 de montrer que le facteur transcriptionnel FOXD1 pourrait jouer un rôle important dans cette pathologie. La démonstration définitive passe par l'analyse d'une souris où le FOXD1 d'une espèce a été substitué par celui de l'autre espèce.

L'objectif du présent projet est d'obtenir cette preuve définitive en utilisant des souris 'Knock-in' déjà réalisées où cette substitution a été faite.

Les animaux seront évalués pour la résorption embryonnaire par ultrasonographie. Les mesures non invasives (par échographies haute fréquence) seront réalisées sous anesthésie.

Le phénotype de résorption embryonnaire ne peut se tester que sur des animaux. En effet, l'utérus et le placenta sont des tissus spécialisés interagissant in vivo chez les mammifères placentaires. L'étude des mécanismes d'implantation, d'échec d'implantation, de pathologies placentaires ne peuvent pas s'étudier sur des cellules en culture. Les rongeurs sont un modèle physiologiquement très correct de placentation pour l'humain, en dépit d'évidentes différences telles la durée de la gestation. Néanmoins on a dans les deux cas une placentation hémochoriale (« hémo-trichoriale » dans le cas des souris). Dans la mesure du possible et de façon ponctuelle, nous avons néanmoins utilisé des modèles cellulaires pour étudier la régulation de gènes cibles de FOXD1. Ces modèles intéressants, ne peuvent néanmoins se substituer à l'étude de l'interaction utéro-placentaire. Le principe de « remplacement » a donc été réfléchi dans le protocole proposé. Une estimation du nombre nécessaire est de 50 femelles gestantes et d'environ 5 fœtus par femelles, soit 200 fœtus.

799- Cette expérimentation prend place dans un programme de recherches visant à évaluer et développer les possibilités de sélection pour une meilleure adaptation de la truite arc en ciel à son milieu d'élevage. Les poissons d'élevage sont soumis à de multiples stress, notamment liés aux contraintes d'élevage ou au changement global : évolution de l'aliment pour utiliser des matières premières non marines et changement climatique. Le changement climatique est susceptible d'impacter de nombreux paramètres de qualité de l'eau, notamment la température et la quantité d'oxygène de l'eau. On étudiera la variabilité génétique de la thermotolérance (résistance à un stress aigu de température) et de la résistance à l'hypoxie (résistance à un stress aigu). On étudiera aussi les liens entre ces deux types de résistance (les génotypes résistants à l'hypoxie sont-ils résistants à la thermotolérance ?) et les interactions thermotolérance-pisciculture car la thermotolérance des mêmes génotypes est étudiée dans une autre pisciculture expérimentale.

L'étude sera réalisée avec des lignées isogéniques hétérozygotes de truite arc-en-ciel produites en décembre 2012. Tous les individus d'une lignée possèdent le même génotype. Chaque lignée est issue du croisement par fécondation classique de deux parents totalement homozygotes. Dans une lignée tous les individus possèdent le même génotype mais sont hétérozygotes et sont donc des poissons qui grandissent et survivent normalement.

L'utilisation de ces lignées sera mutualisée avec des expérimentations sur la qualité de la chair et sur les effets du stress de transport dont les protocoles sont soumis à autorisation par ailleurs. Cela permettra une économie d'échelle quant à la production des poissons, la mutualisation des performances zootechniques des différentes lignées sur les mêmes poissons (croissance, survie) et la mise en relation des réponses aux différents stress et aussi les liens entre résistance aux stress et qualité de la chair (notamment la texture).

Cette étude ne peut être réalisée que sur animaux. Le nombre de lignées isogéniques hétérozygotes utilisées est nécessaire pour pouvoir mettre en évidence de manière significative la variabilité génétique. Le nombre de poissons par lignée et par stress est défini pour obtenir une puissance statistique suffisante.

800- Les douleurs neuropathiques sont des douleurs chroniques qui apparaissent spécifiquement après atteintes du système nerveux, Elles concernent 70% des personnes ayant subi une lésion de la moelle épinière et ont un impact considérable sur la dégradation de leur qualité de vie. Très handicapantes, elles interfèrent de plus avec les thérapies de rééducation motrice. Ces douleurs sont résistantes à la plupart des traitements disponibles. Les médicaments actuellement utilisés ont soit une efficacité inconstante (antidépresseurs, antiépileptiques), soit des effets indésirables importants (dérivés de la morphine).

Dans ce programme, nous cherchons à mettre au point un modèle de douleurs neuropathiques après lésion partielle de la moelle épinière chez le rat ainsi que des protocoles de tests de douleurs d'origine mécanique et thermique. Ce modèle nous permettra de tester l'efficacité de nouveaux principes thérapeutiques pour le traitement des douleurs neuropathiques chroniques survenant après lésion médullaire.