



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (10)

901- Les troubles bipolaires sont parmi les maladies mentales les plus sévères, fréquentes et dévastatrices. Ils se caractérisent par une alternance d'épisodes maniaques (excitation, euphorie, irritabilité, etc.) et d'épisodes dépressifs, entrecoupés de phases de rémission. Ces troubles de l'humeur sont extrêmement hétérogènes cliniquement, freinant l'identification des facteurs de vulnérabilité génétique et environnementaux qui sous-tendent l'apparition de la maladie. Notre équipe a montré que les patients qui présentent un âge précoce d'apparition des premiers symptômes ont un tableau clinique homogène et ont plus d'apparentés atteints dans leur famille. Nous avons récemment identifié des mutations chez des patients avec une forme à début précoce de trouble bipolaire dans un gène nommé CADPS et impliqué dans les échanges de signaux entre les cellules nerveuses. L'objectif de notre projet est d'étudier les mécanismes moléculaires dans lesquels est impliqué le gène Caps1 au moyen de cultures de neurones de souris sauvages et mutantes. En accord avec la règle des 3R, nous avons réduit le nombre d'animaux au maximum en utilisant les femelles qui ne sont pas utilisées dans l'expérimentation pour les accouplements des générations futures et aucune expérience ne sera faite sur animal vivant afin d'éviter les souffrances. Par ailleurs, nous utilisons autant que possible des modèles cellulaires dérivés de lignées cellulaires. 732 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se déroulera sur 3 ans.

902- Dans le cadre du développement de nouvelles protéines thérapeutiques et de thérapies innovantes dans le domaine de l'hémostase, des programmes de recherche et de développement sont mis en place pour valider ces nouvelles protéines avant leur mise sur le marché ou pour trouver de nouvelles indications thérapeutiques à des produits déjà commercialisés.

L'objectif de ce projet est d'étudier dans un modèle murin d'hémophilie A, l'efficacité et la pharmacocinétique de nouveaux facteurs de la coagulation (protéines humaines d'origine plasmatisque ou recombinantes). Ce projet présente aussi le protocole d'élevage des souris hémophile A.

L'efficacité et la pharmacocinétique des molécules sont étudiées chez la souris déficiente en factor VIII (souris knock-out (KO) FVIII). Ces souris ont moins de 1% de FVIII en circulation, un temps de saignement plus prolongé que les souris sauvages, et sont couramment utilisées pour évaluer l'efficacité de différents facteurs de la coagulation. Le modèle d'efficacité consiste à couper l'extrémité de la queue et à compter le temps jusqu'à l'arrêt du saignement et mesurer la quantité de sang perdu sur une période de 30 minutes. Un produit efficace réduit significativement ces deux paramètres en comparaison avec un produit contrôle (NaCl ou tampon de formulation). La pharmacocinétique des molécules est étudiée en dosant à plusieurs temps la concentration plasmatique de la molécule administrée. Des souris sauvages sont aussi utilisées dans ce projet comme contrôles.

L'étude d'efficacité est effectuée sur animal qui est anesthésié pendant toute la période de coupe de la queue pour éviter toute souffrance. En fin d'expérimentation, l'animal est euthanasié. Une étude comprend entre 30 et 60 souris KO FVIII. Différentes concentrations de la molécule à analyser sont testées et/ou deux molécules sont comparées. Huit à 12 souris/groupes sont nécessaires pour avoir des analyses statistiques représentatives. En moyenne, 3-4 concentrations de la molécule sont testées et un groupe d'animaux reçoit du NaCl ou du tampon de formulation. Par année, 6 à 8 études pourront être réalisées avec donc un maximum de 480 souris KO FVIII utilisées. Pour 3 ans, l'estimation est de 1440 souris KO FVIII. Une étude par an sera effectuée avec des souris sauvages, ce qui fait un maximum de 180 souris sauvages.

Chaque étude de pharmacocinétique est effectuée sur animal vigile qui est anesthésié avant le prélèvement. Les souris hémophiles ne sont prélevées qu'une fois pour éviter toute interférence entre le produit injecté et les désordres de la cascade de la coagulation chez ces souris déficientes. Après ce prélèvement, les souris sont euthanasiées. Une étude comprend entre 27 et 54 souris pour une dose de produit.

Trois à six souris sont utilisées par temps de prélèvement avec en moyenne 9 temps de prélèvement. Par année, 4 à 6 études pourront être réalisées avec donc un maximum de 324 souris utilisées. Pour 3 ans, l'estimation est de 972

souris. Une étude par an sera effectuée avec des souris sauvages, ce qui fait un maximum de 162 souris sauvages. La procédure expérimentale chez ces souris est la même que pour les souris KO FVIII afin de pouvoir correctement comparer les données.

L'élevage des souris KO FVIII se fait par croisement d'un mâle avec deux femelles KO FVIII. Toute la descendance est KO FVIII aussi bien les mâles que les femelles. Un maximum de 240 souris mises en accouplement est prévu sur toute la durée du projet.

Actuellement, aucun modèle in vitro, ne permet de déterminer l'efficacité et les propriétés pharmacocinétiques des nouvelles molécules coagulantes. Cependant, des tests in vitro préalables sont réalisés et une revue de la littérature est effectuée afin de s'assurer que les molécules sont actives chez la souris KO FVIII avant l'étude chez l'animal.

903- Les immunoglobulines humaines polyvalentes de type IgG, obtenues à partir de plasma humain, sont commercialisées depuis plus de 15 ans et permettent de guérir un nombre importants de pathologies (déficit immunitaire primitif, purpura thrombopénique idiopathique, Syndrome de Guillain-Barré, maladie de Kawasaki, allogreffe de moelle osseuse, ...).

De nombreux dosages analytiques permettent de s'assurer de la qualité des immunoglobulines purifiées assurant ainsi son efficacité et sa tolérance chez les patients.

Une des fonctions des immunoglobulines est de reconnaître des motifs à la surface des cellules étrangères à l'hôte et d'activer les cellules humaines (globules blancs) afin de détruire ces cellules étrangères (ADCC, « Antibody-dependent cytotoxicity assay », cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante).

Un des dosages assurant le maintien après purification des immunoglobulines de cette activité essentielle fait appel à des globules rouges de lapins et à des globules blancs humains. Les immunoglobulines se fixent d'un côté à la surface des globules rouges de lapins présentant des sites antigéniques spécifiquement reconnus par certains anticorps contenus dans les immunoglobulines humaines et de l'autre côté aux globules blancs activant ces derniers qui vont alors détruire les globules rouges.

Pour effectuer ce dosage, il est indispensable d'avoir au même moment des globules rouges de lapins et des globules blanc humains collectés le jour même. Les globules blancs sont issus de 6 donneurs afin de réduire la variabilité inter-individuelle.

L'approvisionnement en sang humain via l'Etablissement Français du Sang (EFS) est trop aléatoire pour prévoir un prélèvement de sang de lapin chez un fournisseur agréé. En effet, ces prélèvements sont dépendant des dons de sang souvent planifiés la veille pour le lendemain alors que la commande de sang de lapin chez un fournisseur agréé requiert au moins 48h (commande, prélèvement et transport). De plus, la réalisation des prélèvements par un nombre restreint d'expérimentateurs permet de standardiser la qualité du prélèvement et ainsi des globules rouges ce qui réduit la variabilité.

Les globules rouges humains de donneurs de sous-groupe A1 et A2 pourraient également être utilisés pour ce dosage car ils présentent également des sites antigéniques reconnus par certains anticorps présents dans les immunoglobulines humaines. Cependant la fréquence de ces phénotypes ABO dans la population (50% de la population) limite leur disponibilité. De plus, il est nécessaire de connaître le phénotype du donneur à l'avance car le résultat du phénotypage ABO du prélèvement n'est disponible qu'au plus tôt le lendemain du prélèvement. Ces contraintes rendent l'utilisation de globules rouge impossible pour ce dosage réalisé en routine.

En fonction de la disponibilité de sang frais humain, un volume de sang correspondant au maximum à 10% du volume sanguin d'un lapin (poids corporel ≥ 2.2 kg) est prélevé sur l'animal vigile au niveau de l'artère auriculaire. Le volume prélevé est compensé par une injection d'un volume équivalent de sérum physiologique à 0.9% afin d'éviter tout stress hypovolémique et un minimum de 2 semaines de repos sont prévues entre chaque prélèvement. Généralement un seul lapin est nécessaire. Ce lapin est hébergé dans la même salle avec d'autres lapins inclus dans d'autres projets et a ainsi un contact visuel et olfactif avec ses congénères ainsi que de la musique.

Le nombre de lapins utilisés durant le projet (3 ans) est de 9 lapins (1 lapin tous les 4 mois).

904- L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la différence de sensibilité cardiovasculaire au traitement anti-cancéreux à la doxorubicine. Une attention particulière sera portée aux modifications hémodynamiques in vivo et in vitro au métabolisme énergétique, aux fonctions mitochondriales et aux voies de signalisation énergétiques. Ce volet est développé au travers des plateformes et des expertises complémentaires présentes dans l'équipe, l'unité U-769 et sur le site de la Faculté de Pharmacie. A plus long terme il peut permettre d'approfondir nos connaissances des mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines et ainsi à plus long terme de proposer des thérapies plus ciblées, en fonction du sexe, et d'apporter des possibilités de prévention de ces effets indésirables des anthracyclines.

905- Le néocortex joue un rôle essentiel dans la catégorisation des objets perçu à travers différents canaux sensoriels en percepts supra-modaux. Les aires du néocortex traitant différentes modalités sensorielles sont largement interconnectées, mais la fonction computationnelle de ces connections est inconnue. Le but du protocole est d'utiliser des méthodes d'enregistrement haute-densité combinées à des méthodes d'inactivation optogénétiques pour

déterminer si les connexions hétéromodales des aires corticales primaires transmettent des inférences permettant d'unifier la représentation corticale d'un objet perçus à travers plusieurs canaux sensoriels.

L'objectif à long terme est de mettre à jour de nouveaux principes computationnels par lesquels le cerveau construit des représentations invariantes de l'environnement.

Cette étude sera conduite chez la souris vigile pendant une tâche de discrimination d'objets multimodaux.

Un nombre prévisionnel de 360 souris sur trois ans seront utilisées. Les méthodes d'enregistrement de pointe (imagerie calcique bi-photon, enregistrement extracellulaire multicanaux) utilisées dans le projet permettront de collecter un large corpus de données sur l'activité corticale durant un comportement perceptif complexe. Cela permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés pour obtenir une très haute valeur statistique sur les résultats.

D'autre part l'utilisation de la souris pour une étude fondamentale sur les mécanismes computationnels des réseaux corticaux devrait permettre des avancées conceptuelles pouvant épargner dans une certaine mesure l'utilisation d'espèces aux capacités cognitives plus complexes mais plus sensibles, tel que le singe.

906- Les caries dentaires et les inflammations pulpaires (pulpites) sont parmi les infections bactériennes les plus courantes chez les humains, cependant, la réponse immunitaire face à ces agressions bactériennes est très peu connue. La dent est une entité anatomique et fonctionnelle particulière constituée de tissu dur (émail et dentine) entourant un tissu conjonctif: la pulpe dentaire. Ce tissu conjonctif ressemble à d'autres tissus conjonctifs retrouvés dans le corps humain mais possède des spécificités (présence d'odontoblastes, cellule immunocompétente possédant un rôle de sécrétion de dentine).

En présence d'une carie (infection bactérienne chronique), la pulpe dentaire est capable d'élaborer une réponse immunitaire innée dans un premier temps et ensuite spécifique d'antigène. Ces phénomènes sont connus mais très peu décrits. Des analyses quantitatives de cellules immunitaires (Natural Killer, cellules dendritiques, lymphocytes) ainsi que des profils de chémokines et de cytokines sont manquants à l'heure actuelle. Il est très difficile de calibrer des inflammations pulpaires, et impossible d'un point de vue éthique d'en créer chez l'homme. C'est pourquoi la création d'un modèle animal ici le rat est indispensable. Notre projet est de créer une inflammation pulpaire au niveau des incisives de rat en injectant du lipopolysaccharide (antigène bactérien classiquement utilisé dans le modèle de la carie dentaire) dans une cavité atteignant la pulpe dentaire. Nous souhaitons étudier l'effet d'agents immunorégulateurs sur ces pulpites induites expérimentalement. Pour cela, nous allons regarder à différents temps (J1, J3 et J7) les variations (quantitatives et spatiales) des cellules immunitaires dans la pulpe dentaire. Cette étude est la première étape qui évalue la faisabilité, la reproductibilité et les cellules immunitaires impliquées à différents temps du processus inflammatoire.

907- Dans le cadre du développement de nouvelles protéines thérapeutiques dans le domaine de l'hémostase, des programmes de recherche sont mis en place pour identifier, sélectionner et valider ces nouvelles protéines. La preuve de concept de l'efficacité des produits dans au moins un modèle animal pertinent est une condition indispensable avant leur passage en développement.

Une protéine qui joue un rôle crucial et central dans le mécanisme de la coagulation est le facteur X activé (FXa). Cette molécule clive la molécule de prothrombine et entraîne la génération de thrombine, puis du caillot, arrêtant ainsi le saignement. En situation physiologique, cette molécule a un temps de demi-vie plasmatique très court et une activité thrombotique potentielle très importante. Par biologie moléculaire, différentes molécules de FXa modifiées (demi-vie plus longue ou avec une activité thrombotique réduite) ont été ou seront générées. Ces molécules pourraient permettre de restaurer la coagulation dans des situations pathologiques variées et pour lesquelles il n'y a pas de traitements disponibles ou des traitements partiels.

Une de ces situations pathologiques survient après l'utilisation de nouveaux anticoagulants oraux (NAO) qui inhibent de façon directe ou indirecte le facteur Xa. En effet, les NAO qui sont utilisés en prophylaxie pour limiter l'apparition de troubles thromboemboliques peuvent induire des hémorragies spontanées ou induites par un traumatisme. Aucun antidote efficace n'existe à ce jour et des cas de décès suite à des saignements incontrôlés commencent à être décrits (cf. recommandations HAS, octobre 2013). Le premier objectif de ce projet est donc d'identifier des molécules issues du facteur Xa qui pourraient inhiber l'activité anticoagulante des NAO. Ces molécules seront testées dans un modèle de temps de saignement de la queue chez la souris normale mise sous anticoagulants. La première phase consistera à la mise en place de ce modèle puis la deuxième phase à tester différents facteurs Xa modifiés ou natifs.

L'autre situation pathologique envisagée est le traitement de l'hémophilie A et B avec et sans inhibiteurs. Des traitements existent mais ils ne sont pas complètement satisfaisants. Le deuxième objectif de ce projet sera d'évaluer la capacité des FXa modifiés à restaurer la coagulation dans l'hémophilie A et B. Pour ce faire, les FXa modifiés seront testés dans un modèle de temps de saignement de la queue chez la souris hémophile (déficiente en FVIII et FIX avec ou sans inhibiteurs)

Le modèle du temps de saignement de la queue est effectué chez la souris anesthésiée pour éviter toute souffrance. En fin d'expérimentation, l'animal est euthanasié. Ce modèle consiste à couper l'extrémité de la queue et à compter le temps jusqu'à l'arrêt du saignement et mesurer la quantité de sang perdu sur une période de 10 à 30 minutes. Un produit efficace réduit significativement ces deux paramètres en comparaison avec un produit contrôle négatif.

Le nombre de souris estimé est de 720 à 1080 souris normales pour atteindre le premier objectif et de 1440 à 2160 souris déficiente en FVIII et 1440 à 2160 souris déficiente en FIX pour le deuxième objectif.

908- Depuis qu'ont été établies

-des colonies de souris de laboratoire axéniques élevées et maintenues en isolateurs,
-des colonies de souris de laboratoire gnotobiotiques hôtes- au niveau de la lumière de l'intestin- de bactéries symbiotes cultivables, élevées et maintenues dans des animaleries où ne se perpétue aucun microbe invasif pour les souris de laboratoire, il a été possible d'identifier que des interactions bactéries symbiotes -souris hôtes contribuent non seulement à la complétion de la biogénèse et à des fonctions physiologiques du système immunitaire intestinal mais aussi au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de tissus distants du tube digestif.

Il est essentiel d'identifier et de caractériser qualitativement et quantitativement les processus directs et indirects qui rendent compte de ces fonctions physiologiques d'agonistes bactériens détectés par les senseurs de souris: tel est l'objectif du projet pour lequel nous soumettons cette demande d'autorisation.

L'objectif de ce projet est de déterminer le potentiel modulateur de bactéries probiotiques sur le statut immunitaire général de mammifères modèles, les souris de laboratoire. Pour atteindre cet objectif nous nous intéresserons à des processus immunitaires intestinaux et systémiques dans différents contextes :

- recours à des antibiotiques administrés par l'eau de boisson et administration par gavage oral par catheter de bactéries probiotiques, en particulier de souches de Lactobacilles.

- souris chez lesquelles sera induite soit une colite aigue soit une colite chronique et auxquelles seront administrées des bactéries probiotiques

- souris auxquelles seront administrés des vaccins et chez lesquelles seront analysées l'efficacité de ces vaccins

Pour explorer et caractériser l'impact de bactéries probiotiques sur les réponses immunitaires systémiques, nous estimons à 1500 le nombre de souris auxquelles nous devons recourir. Le degré de sévérité des procédures expérimentales dans lesquelles sont inclus les animaux est soit léger soit modéré.

909- Les mucines sont de grandes protéines fortement glycosylées entrant dans la composition de nombreux mucus et dans la protection des muqueuses épithéliales des voies aériennes et digestives.

Ce projet a pour objectif la caractérisation des souris invalidées pour les gènes de mucines Muc2, Muc5ac et Muc4 et notamment de déterminer leur implication dans la différenciation et les pathologies gastrointestinales.

Le rôle des mucines sera étudié pour :

- colite inflammatoire (144 souris)
- pancréatite (54 souris)
- développement du tractus gastrointestinal (180 embryons)

L'effet de l'invalidation des mucines sur les symptômes cliniques, histologiques seront évalués dans des modèles murins knock out.

Nombre de souris = 198 souris + 180 embryons

Il s'agit de l'étude d'un modèle physiopathologique dont la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro.

Le nombre d'animaux par groupe est prévu pour avoir un effectif minimum et suffisant (suivant la règle des 3R, réduction, raffinement et remplacement) permettant une analyse statistique significative (tests Mann Whittney, Kruskal Wallis et Dunns, calcul des effectifs par epiR package 0.9-30)

910- Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux et souffre d'un très mauvais pronostic dû en partie à un diagnostic tardif et à un manque de traitement efficace.

La mucine MUC4 est une oncoprotéine transmembranaire exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales polarisées et impliquées dans les interactions cellulaires et dans la signalisation cellulaire. La surexpression et la délocalisation circonférentielle de MUC4 dans de nombreux cancers épithéliaux (pancréas, poumon, œsophage) est souvent associée à un mauvais pronostic.

Nous avons mis en évidence in vitro l'activité intrinsèque des domaines de MUC4 sur la prolifération et la migration cellulaires.

Il s'agit de l'étude d'un modèle physiopathologique préclinique de progression carcinogénétique dont la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro

L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux marqueurs pronostiques est une priorité car en dépit des améliorations dans la détection, de la résection chirurgicale et des thérapies, la survie dans le cancer du pancréas reste plus faible que dans les autres tumeurs solides. Cette identification est subordonnée à la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la progression tumorale. Or les connaissances restent limitées et l'implication directe de la mucine MUC4 reste à démontrer.

C'est donc dans ce contexte que se situe notre projet de recherche.

Les retombées de ce projet fondamental permettront d'apporter aux cliniciens de nouvelles cibles thérapeutiques permettant la prise en charge de la pathologie.

Nombre de souris prévues = 158

Les modèles murins étudiés sont le modèle préclinique de cancérogenèse pancréatique : Pdx1-Cre ; LstopL-KrasG12D et le modèle murin Muc4KnockOut (KO).

Le nombre d'animaux par groupe est prévu pour avoir un effectif suffisant (suivant la règle des 3R) permettant une analyse significative en tenant compte de la fréquence d'apparition des altérations néoplasiques (ainsi, les cohortes à 1 an sont plus importantes afin d'observer l'apparition d'adénocarcinome statistiquement moins fréquente)

911- Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux et souffre d'un très mauvais pronostic dû en partie à un diagnostic tardif et à un manque de traitement efficace.

La mucine MUC4 est une oncoprotéine transmembranaire exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales polarisées et impliquées dans les interactions cellulaires et dans la signalisation cellulaire. La surexpression et la délocalisation circonférentielle de MUC4 dans de nombreux cancers épithéliaux (pancréas, poumon, œsophage) est souvent associée à un mauvais pronostic.

Nous avons mis en évidence in vitro l'activité intrinsèque des domaines de MUC4 sur la prolifération et la migration cellulaires.

Notre objectif est d'étudier l'activité biologique des domaines de MUC4 lors de la cancérogenèse pancréatique (progression carcinogénétique, métastase).

Les retombées de ce projet fondamental permettront d'apporter aux cliniciens de nouvelles cibles thérapeutiques permettant la prise en charge de la pathologie.

Il s'agit de l'étude d'un modèle physiopathologique préclinique de progression carcinogénétique dont la complexité et la cinétique ne peuvent être reproduites in vitro. L'étude du rôle des domaines de MUC4 est basée sur des résultats obtenus in vitro via des modèles cellulaires. Les résultats obtenus in vitro sont très prometteurs. L'aspect de progression au cours de la carcinogénèse ne peut être abordé in vitro et donc nécessite l'expérimentation animale.

Nombre d'animaux prévus : 320 souris

Le nombre d'animaux par groupe (10 souris par condition) est prévu pour avoir un effectif suffisant (suivant la règle des 3R) permettant une analyse statistique significative

912- Le cancer du sein reste la pathologie cancéreuse la plus fréquente avec plus d'un million de nouveaux cas dans le monde chaque année. Malgré l'amélioration du diagnostic et des traitements, les mécanismes de résistance aux thérapies anticancéreuses restent mal connus. Dans ce sens, la mise en évidence de nouveaux marqueurs moléculaires d'intérêt clinique reste l'objectif primordial.

Une différence d'expression concernant la protéine DDB2 a été observée entre les tumeurs du sein agressives et les tumeurs non agressives. Cette protéine DDB2 était connue jusqu'alors pour sa participation à la réparation des lésions de l'ADN, mais d'après les données acquises, elle semble également jouer un rôle dans la prolifération de ces cellules cancéreuses et dans la réponse à la chimiothérapie in vitro.

Ce projet vise à confirmer ou infirmer in vivo l'importance de la protéine DDB2 dans la réponse de tumeurs mammaires aux agents anticancéreux tels que le 5-Fluorouracile. Pour ce faire, nous utiliserons 110 souris nude porteuses de tumeurs mammaires humaines, celles-ci exprimant plus ou moins la protéine DDB2.

913- L'homéostasie énergétique est maintenue par un réseau complexe de signaux périphériques et centraux qui renseignent sur le statut nutritionnel d'un organisme et permettent de développer une réponse comportementale et métabolique adaptée. Une dérégulation de ce système aboutit à la mise en place de pathologies telle que l'obésité, le diabète de type 2 et les troubles cardiovasculaires qui sont les principaux composants d'un ensemble de dérèglements rassemblés sous le terme « syndrome métabolique ». La modulation du « nutrient partitioning » c'est à dire la capacité d'un organisme à gérer la transformation, le stockage et l'utilisation des substrats énergétique (lipides, glucides, protide) et un mécanisme déterminant dans l'apparition dans l'homéostasie énergétique. Nous avons récemment mis en évidence le rôle clé d'une population neuronale hypothalamique dans la coordination des tissus périphériques et la gestion du « nutrient partitioning ». Nous voudrions maintenant pouvoir manipuler directement ces populations via une approche optogénétique afin d'évaluer directement leur implication dans la régulation de l'efficacité métabolique par calorimétrie indirecte. Cette étude ne peut être remplacée par d'autres moyens car nous regardons les dialogues neuronaux ainsi qu'inter-organes, et utilisera le minimum de souris nécessaire et respectant le plus possible le bien être animal (raffinement des procédures, anesthésie et analgésie, et amélioration de leur environnement, nid végétal). Au cours de cette étude de 3 ans environs 540 souris (mus musculus) seront utilisées. Sur ces différents animaux nous allons effectuer différentes expérimentations permettant d'évaluer le métabolisme de ces modèles en cages métabolique (cages calorimétrique), ainsi que d'évaluer leur comportement et motivation en fonction des populations neuronales et/ou astrocytaires stimulées ou non (mur opérant, comportement alimentaire, préférence de place). A la fin des expériences la mise à mort des animaux se fait par dislocation cervicale.

914- Dans les sociétés où l'espérance de vie ne cesse d'augmenter, la surdité liée à l'âge ou « presbyacousie » est un problème majeur de santé publique. La presbyacousie est une pathologie multifactorielle faisant intervenir une combinaison de facteurs individuels (âge, génétique) et environnementaux (exposition au bruit, prise de médicaments). On estime que 16 % de la population adulte est affectée par cette pathologie. A ce jour, les mécanismes responsables de la presbyacousie sont mal connus et il n'existe pas de thérapie pour ralentir ou stopper la presbyacousie.

Dans des travaux antérieurs, nous avons identifié plusieurs mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégénérescence des cellules sensorielles et neurales de la cochlée (organe périphérique de l'audition) chez deux lignées de souris présentant une surdité précoce liée à l'âge, équivalente de la presbyacousie chez l'homme : la lignée mutante SAMP8 (Senescent accelerated mouse prone 8) et la lignée transgénique OPA1 (Optical Atrophy Dominant). Sur la base de ces travaux, des études in vitro sur des cultures organotypiques de cochlées prélevées chez ces deux lignées de souris, nous ont permis d'établir l'efficacité thérapeutique potentielle de certains outils pharmacologiques et géniques ciblés sur ces mécanismes physiopathologiques.

L'objectif du projet actuel est de développer et de mettre en oeuvre chez ces deux lignées de souris, des stratégies thérapeutiques expérimentales in vivo capables de ralentir, voire stopper l'apparition des pertes auditives liées à l'âge. Pour cela, les molécules sélectionnées in vitro seront administrées directement dans les cochlées de ces souris. Des tests auditifs objectifs seront réalisés avant et 3 mois après le traitement chez les animaux traités afin d'évaluer les éventuels effets thérapeutiques de ces molécules. Un nombre total de 143 animaux est prévu pour la réalisation de ce projet dont nous estimons la durée à 3 ans.

Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Nous veillerons notamment à :

- utiliser un nombre minimum et suffisant d'animaux
- héberger les souris dans un environnement enrichi
- anesthésier les animaux pour les interventions chirurgicales et les tests fonctionnels
- suivre assidûment les animaux en cours d'expérimentation
- appliquer des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées

915- L'HTAP est une maladie vasculaire pulmonaire rare et grave, caractérisée par l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP idiopathique), dans un contexte familial (HTAP familiale) ou compliquer l'évolution de certaines pathologies (connectivite, cardiopathie congénitale avec shunt, hypertension portale, infection par le VIH) ou être associée à certaines situations particulières (ex : prise d'anorexigènes).

Si l'HTAP reste une maladie relativement rare, sa prévalence minimale en France étant estimée à 15 cas sur 1 million d'adultes, elle est mortelle à très courte échéance (2,8 ans) si elle n'est pas diagnostiquée et traitée. Les symptômes initiaux de l'HTAP, tels que dyspnée à l'effort, lipothymie et asthénie, peuvent être légers et peu spécifiques. Il est ainsi fréquent que le diagnostic soit posé à des stades avancés de la maladie, après plusieurs mois d'errance diagnostique pour les patients.

En identifiant et en traitant les patients le plus tôt possible, il est possible de retarder la progression de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Sans traitement spécifique, les patients souffrant d'HTAP modérée (stade 2 sur 4 selon les stades de la dyspnée définis par la New York Heart Association, NYHA) peuvent voir leur état se détériorer rapidement et atteindre en 6 mois un stade d'hypertension artérielle pulmonaire sévère.

Les options thérapeutiques ont progressé de manière considérable ces dix dernières années, en particulier celles qui s'attaquent aux mécanismes sous-jacents de la maladie. Trois principales voies métaboliques sont impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP et constituent les cibles des traitements spécifiques : la voie de l'endothéline, la voie du monoxyde d'azote et la voie de la prostacycline. En parallèle, la recherche de médicaments ciblant de nouveaux mécanismes physiopathologiques représente un enjeu majeur pour les années à venir. Les tests de nouvelles molécules doivent se réaliser sur des modèles animaux prédictifs de la maladie, afin d'optimiser la sélection des candidats médicaments qui entreront en phases d'essais cliniques. L'objectif de ces études consiste donc à évaluer, chez l'animal, l'efficacité de nouveaux candidats médicaments sur un modèle d'HTAP chez le rat induit par l'administration de monocrotaline ou induite par une hypoxie chronique. Dans le cadre de ces études, les animaux reçoivent une administration de monocrotaline ou sont soumis à une hypoxie chronique de 3 semaines. L'efficacité de composés candidats peut alors être évaluée tout au long du protocole à l'aide d'une mesure échocardiographie, et/ou en fin de protocole par mesure des pressions systémique et ventriculaire droite et évaluation du niveau d'hypertrophie du ventricule droit. Les données obtenues pour chaque paramètre peuvent être comparées aux données obtenues sur des animaux ayant reçu un traitement de référence et permettre ainsi l'évaluation précise de l'efficacité de nouveaux candidats médicaments. Ces 2 modèles d'HTAP réalisés chez le rat comptent parmi les modèles les plus classiquement utilisés et sont validés par des plusieurs molécules de référence comme les antagonistes des récepteurs à l'endothéline et les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5.

Le modèle d'HTAP qui se développe consécutivement à l'exposition à une hypoxie chronique mime la pathologie de stade modéré alors que le modèle induit par la monocrotaline correspond à un stade plus sévère de la pathologie. Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe contrôle négatif, un groupe contrôle positif, 1 groupe 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), et un groupe incluant un

composé de référence, le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 60 animaux ; pour un total de 25 séries sur 5 ans, soit 1500 animaux.

916- *Staphylococcus aureus* (communément appelé staphylocoque doré) est une bactérie 1 commensale de l'homme et de nombreuses espèces animales. Aux vues de la grande fréquence des infections staphylococciques communautaires et hospitalières et des difficultés thérapeutiques qu'elles entraînent du fait de l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques, *S. aureus* constitue un problème majeur de santé publique. Le grand défi de la recherche actuelle est la mise au point de nouveaux agents antibactériens capables d'échapper aux mécanismes de résistance.

De rares études suggèrent que des protéines membranaires des cellules du système 1 respiratoire, appartenant à la famille des PARs (Protease-Activated Receptors)¹, participent à la réponse de l'organisme face à une infection bactérienne. En particulier, l'activation de PAR2 induirait une activité antibactérienne vis-à-vis de divers types bactériens *in vitro* et *in vivo* (souris). *In vitro* (co-cultures de cellules pulmonaires humaines et de *S. aureus*), nous avons identifié un effet des agonistes et antagonistes des PARs sur l'infection à *S. aureus* : il apparaît que l'antagoniste de PAR1 et l'agoniste de PAR2 ont un rôle protecteur en inhibant l'infection bactérienne. Le but de ce protocole est de vérifier si nous retrouvons ce rôle antimicrobien *in vivo* après traitement de souris infectées par *S. aureus* avec des composés agonistes et antagonistes de PAR1 et PAR2. Cette validation pourrait ouvrir la porte à une utilisation thérapeutique de ces molécules. Pour cela, le protocole prévoit l'utilisation de 108 souris C57Bl/6. Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants.

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

917- Un faisceau d'arguments expérimentaux et épidémiologiques indique que le manque de sommeil, conséquence d'une pathologie du sommeil ou d'un comportement volontaire de restriction de sommeil, est un facteur de risque important de maladies métaboliques telles que l'obésité, le syndrome métabolique et le diabète de type 2. Une meilleure compréhension des effets des perturbations des états de vigilance sur le métabolisme est susceptible de permettre le développement de nouvelles voies thérapeutiques visant à lutter contre les maladies métaboliques, un problème majeur de santé publique.

Plusieurs souris Knock Out (KO) étudiées au sein de notre équipe semblent pouvoir constituer des modèles originaux et pertinents. En effet, elles présentent toutes des états de vigilance altérés, et l'une d'entre elles a déjà été proposée comme modèle d'obésité puisqu'elle présente toutes les caractéristiques de celle-ci.

Afin d'évaluer si les perturbations des états de vigilance de nos différentes souris KO sont liées à des altérations métaboliques, nous évaluerons, pour chacune de ces souris KO des variables comportementales (activité, prise alimentaire), physiologiques (dépense énergétique, métabolisme glucidique, profils lipidiques, concentrations hormonales) et anthropométriques (poids).

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable pour accéder aux mécanismes impliqués dans les effets délétères d'un sommeil court et/ou de mauvaise qualité sur le métabolisme.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser l'état métabolique de nos souris KO et de les comparer à celui de souris sauvages. Pour cela nous devons réaliser un certain nombre de mesure telle que l'activité spontanée, la prise alimentaire, la dépense énergétique, les taux de glucose et d'insuline à jeun et à l'état nourri, les profils lipidiques, les taux d'hormones impliquées dans la régulation de l'appétit, la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline, la structure du foie et du pancréas exocrine et endocrine, la signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux et le muscle et nous étudierons l'expression des gènes du métabolisme sur certaines structures cérébrales et périphériques.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 240 souris. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs lignées génétiquement modifiées sur un grand nombre de mesure qui ne seront pas toutes réalisées sur le même animal.

Nous désirons étudier les souris à 3 âges différents afin d'appréhender les effets du vieillissement sur le phénotype métabolique.

3) Raffinement

Ces travaux de recherche fondamentale nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivant dans de bonnes conditions psychophysiologiques.

Le stress ayant une influence directe sur les mesures réalisées, le bien-être des animaux est impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. 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.

918- La polykystose rénale humaine (PKD) est une maladie génétique caractérisée par la formation de kystes conduisant à une insuffisance rénale terminale. Il n'existe pas jusqu'à présent de traitement préventif ou curatif efficace. Deux gènes, PKD1 et PKD2 sont en grande partie responsables du développement de la maladie, mais d'autres gènes sont également impliqués. Nous avons croisé des souris qui sont mutées dans un gène et présentent spontanément des kystes dans le rein avec des souris qui ne produisent pas une protéine, la MMP9 pour évaluer si cette protéine exerce un rôle protecteur ou délétère dans le développement des kystes, ce qui peut avoir des effets thérapeutiques importants. Ce projet est soutenu par l'AIRG (Association pour l'Information et la Recherche sur les maladies Rénales Génétiques). Selon le principe des 3R, nous serons attentifs à utiliser un nombre minimal de souris (360 animaux maximum) qui sont manipulées et maintenues dans des conditions d'hébergement répondant à la réglementation avec un enrichissement du milieu (litière cellulose et bûche de peuplier) assurant aux animaux la possibilité d'effectuer des activités de tri, rognage, jeu (déplacer, monter sur la bûche) tout en favorisant la nidification et donnant la possibilité aux animaux de se cacher. Les souris Nek8 -/- sont euthanasiées le plus tôt possible (3 mois) afin d'éviter le développement de la maladie. Elles seront observées quotidiennement et pesées 1 fois par semaine pour évaluer si elles présentent des signes de souffrances. Si tel est le cas, l'origine pouvant être une insuffisance rénale liée à l'apparition de kystes dans le rein, le protocole sera arrêté et les souris euthanasiées.

919- Les parodontites sont des maladies chroniques destructrices de type inflammatoire, d'origine bactérienne, atteignant la gencive et les tissus de soutien des dents (cément, ligament parodontal, os alvéolaire). L'alvéolyse (ou destruction du tissu dentaire) est l'une des conséquences de la parodontite.

Sans traitement, l'évolution conduit à la perte des dents.

Près de 50 % des adultes en France (plus de 35 ans) sont atteints par une maladie parodontale, qui a pour conséquence la perte des tissus parodontaux et, en particulier, la perte du tissu osseux qui entoure les dents (alvéolyse).

Par voie de conséquence, on observe un affaissement de la gencive interdentaire (papilles) qui repose sur le tissu osseux, avec apparition de « trous noirs » inesthétiques.

Les traitements actuels permettent de stopper la destruction tissulaire et la douleur engendrée, mais il n'existe pas à ce jour de thérapeutique permettant de régénérer intégralement les tissus perdus. Après traitement parodontal, et bien que l'inflammation et la destruction tissulaire soit stoppées, un déficit esthétique persiste donc pour le patient (sourire disgracieux), avec de possibles répercussions sociales.

L'étude vise à évaluer l'influence d'un gel d'acide hyaluronique sur la modification du volume papillaire après injection au niveau de la gencive interdentaire, sur des chiens présentant un déficit osseux interdentaire.

Pour ce faire, une opération chirurgicale sera réalisée sur 8 chiens, afin de créer un défaut osseux au niveau de 5 papilles/chien, à l'aide d'une fraise dentaire.

Par la suite, des brossages de dents seront réalisés (2 fois par semaine), et le gel réparateur injecté (sous anesthésie) 3 semaines après la création du défaut.

Des prélèvements de papilles seront effectués sous anesthésie en fin d'étude.

Cette étude ne nécessite pas l'euthanasie des animaux.

Afin de limiter le stress et la douleur éventuellement engendrés, les mesures suivantes seront mises en place:

- habitude des animaux au brossage des dents avant l'étude, par renforcement positif (utilisation de récompenses)
- utilisation de médicaments antidouleur (antalgiques/analgésiques) lors de toute chirurgie ou prélèvement de gencive.
- application d'un pansement chirurgical favorisant la cicatrisation et diminuant les douleurs post-opératoires après le prélèvement des papilles.

920- Nous nous intéressons au traitement de l'information sensorielle dans le système nerveux central de l'animal éveillé en comportement, dans des conditions proches des conditions d'exploration naturelles. Spécifiquement, nous utilisons comme modèle le système des vibrisses chez le rat. Les relais successifs de traitement de l'information vibrissale sont caractérisés par la présence de structures anatomiques distinctes correspondant aux vibrisses du museau de l'animal et organisés selon la même matrice que sur le museau. Ainsi on trouve des cartes topographiques dans les noyaux trigéminaux, le thalamus, et en couche IV du cortex somatosensoriel primaire. Nous nous intéressons particulièrement à l'intégration multivibrissale dans ces différents relais, qui permet à l'animal d'adapter son comportement en fonction des caractéristiques de stimuli distribués sur plusieurs vibrisses.

Le premier objectif du projet sera de développer des tâches de discrimination vibrissale active dans un labyrinthe simple, dans le noir ou sous lumière infrarouge non visible par l'animal. A chaque essai, le rat devra choisir un site de renforcement positif parmi deux en fonction de stimuli tactiles détectés grâce à ses vibrisses dans le labyrinthe. L'état de motivation et d'attention de l'animal pourra être manipulé en modifiant les paramètres des stimuli et le renforcement.

Le projet se poursuivra par l'implantation de multi-électrodes dans le cortex somatosensoriel, le thalamus et/ou les noyaux trigéminaux permettant l'enregistrement électrophysiologique pendant l'apprentissage. L'activité neuronale sera analysée conjointement avec les mouvements des vibrisses, afin de mettre en relation motifs spatio-temporels vibrissaux et motifs de réponses neuronales. Nous rechercherons également des différences de codage entre les

essais en fonction des différents paramètres comportementaux de l'animal (performance, motivation, attention). Ces recherches nous permettront de mieux comprendre les mécanismes corticaux du codage sensoriel. Nous prévoyons l'utilisation de 150 rats Long-Evans sur 5 ans, dont 120 rats seront utilisés uniquement en comportement (méthode non invasive) et 30 avec implantation pour l'électrophysiologie. L'utilisation d'implants multiélectrodes nous permettra d'enregistrer un grand nombre de cellules à la fois sur un animal et donc de réduire le nombre d'animaux implantés.

921- Le paludisme reste encore à l'heure actuelle un problème de santé publique majeur. L'apparition de résistances aux traitements thérapeutiques et l'absence de vaccin efficace motivent l'intérêt que nous portons à la biologie du parasite responsable : le *Plasmodium*. Dans ce contexte, nous visons à caractériser, tant au niveau moléculaire que fonctionnel, des protéines essentielles pour le parasite.

La plus grande partie de nos expériences fait appel à des techniques de biologie moléculaire et de biochimie. Nous validons ensuite nos résultats sur le parasite dont nous maintenons en culture le cycle érythrocytaire. Les animaux sont utilisés en deuxième approche dans le but soit de générer des parasites génétiquement modifiés en cas d'échec in vitro, soit de tester in vivo des composés à potentiel thérapeutique pour lesquels des tests sur le parasite in vitro auront fourni des résultats prometteurs en termes d'index thérapeutique (rapport activité anti-paludique/toxicité). Ces étapes préalables in vitro nous permettent de présélectionner les gènes/composés d'intérêt et donc de minimiser le nombre d'animaux à utiliser.

Dans ce projet, le nombre total maximum d'animaux utilisés sur la période sera de 240 rats et 2040 souris. Selon le nombre de gènes qui se révèlent essentiels pour le parasite, ce nombre pourra considérablement diminuer.

922- Les inhibiteurs de cycline/CDK de la famille Cip/Kip, comprenant les protéines p21, p27 et p57 sont connues pour leur rôle d'inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Ce rôle de régulateur négatif de la prolifération leur confère globalement des propriétés de suppresseurs de tumeurs et la perte de l'expression de ces protéines est fréquemment observée dans de nombreux cancers chez l'homme.

Cependant, il est de plus en plus reconnu que ces protéines ont également d'autres fonctions et sont impliquées dans le contrôle d'autres processus cellulaires tels que la migration, la survie et la régulation transcriptionnelle. Afin de découvrir ces nouvelles fonctions et d'étudier leur importance in vivo, nous travaillons avec des lignées murines knockout pour soit p27 ou p57 (p27KO et p57KO) et aussi avec des lignées knock-in où des mutations ponctuelles dans ces protéines inactivent uniquement la fonction d'inhibiteur de cycline/CDK mais laisse les autres fonctions intactes (p57CK- et p27CK-).

p57 joue un rôle critique au cours du développement embryonnaire et le knockout du gène résulte en un phénotype de létalité périnatale. p57 est notamment fréquemment impliqué dans le développement du syndrome de Beckwith-Wiedemann chez l'homme, une maladie rare caractérisée par de nombreux défauts au cours de l'embryogénèse. P57 est un gène soumis à l'empreinte génétique et seul l'allèle maternel est exprimé. De ce fait seul les individus héritant un allèle muté de leur mère auront un phénotype.

A l'inverse, p27 est peu exprimé au cours du développement mais joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération chez l'adulte. Le knockout de p27 chez la souris donne un phénotype de gigantisme, où les individus sont environ 30% plus grands que les individus sauvages, causé par une hyperprolifération dans tous les tissus. La perte de p27 cause également l'apparition de tumeurs au niveau de l'hypophyse vers un an d'âge. Ces souris sont par ailleurs plus susceptibles à la tumorigénèse induite par des carcinogènes. Les femelles p27KO et p27 CK sont stériles. Du fait de la létalité périnatale (p57) et de la stérilité des femelles (p27), ces lignées doivent être maintenues à l'état hétérozygote.

Une première partie de notre projet porte sur l'étude des fonctions de p57 au cours du développement et dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann (la souris knockout pour p57 présente de nombreuses similitudes avec ce syndrome). Le but étant de comprendre l'origine de ces défauts et d'en déterminer les mécanismes sous-jacents. Pour cela, nous comparons le développement des souris sauvages, p57KO et p57CK- (knock-in qui ne peut plus inhiber les cycline/CDK) entre E10 et P0. Toutes les études mécanistiques sont réalisées sur cellules (lignées ou primaires dérivées d'embryons) pour minimiser le nombre d'individus requis. Les animaux nécessaires pour ces expériences comprennent ceux requis pour la maintenance des lignées et les femelles gestantes utilisées pour soit collecter les nouveau-nés (P0) ou euthanasiées pour collecter les embryons au stade voulu (E10.5-E18.5).

La seconde partie du projet porte sur l'étude de p27 au cours de la tumorigénèse. En effet, plusieurs laboratoires dont le notre, avons découvert que p27 agit comme suppresseur de tumeur dans le noyau, mais comme un oncogène lorsqu'il est localisé dans le cytoplasme, ce qui est fréquemment observé dans les cancers humains. Comment p27 peut agir comme oncogène reste inconnu pour le moment. Deux organes, le poumon et le pancréas ont été choisis pour étudier le rôle oncogénique de p27 dans la souris adulte. Par ailleurs, autant que possible, des cellules primaires dérivées de nos souris mutantes pour p27 sont utilisées pour toutes les expériences mécanistiques et de biologie cellulaire.

923- Le diabète est la maladie métabolique la plus répandue dans le monde et son évolution pandémique en fait un problème majeur de santé public. Le diabète de type 2, qui représente 90- 95% des patients diabétiques, apparaît

lorsque les tissus impliqués dans le maintien de la normoglycémie ne répondent plus correctement à l'insuline et que la production d'insuline par les cellules β du pancréas est insuffisante. Cette pathologie est étroitement influencée par des facteurs environnementaux comme le vieillissement de la population, sa sédentarisation et sa malnutrition. Si les mécanismes moléculaires impliqués le basculement de la résistance à l'insuline vers le diabète de type 2 ont été au centre de nombreuses recherches scientifiques, ils restent encore à être clairement définis.

Dans ce contexte les protéines SOCS ont longtemps été étudiées en tant que régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline et donc en tant que facteurs potentiellement impliqués dans l'établissement de la résistance à cette hormone. Cependant les SOCS sont également capables d'inhiber le signal induit par les cytokines qui sont largement impliquées dans l'altération de la fonction de diverses cellules, y compris les cellules β pancréatiques.

L'objectif majeur de notre projet est de déterminer le rôle des protéines SOCS dans l'insulinorésistance et le passage vers le diabète de type 2. Ces désordres métaboliques étant le reflet de l'altération de plusieurs tissus, une étude in vivo sur des animaux génétiquement modifiés est indispensable pour répondre à ces questions. C'est pour cela que nous avons généré il y a plusieurs années des lignées de souris transgéniques (fond C57Bl6) exprimant SOCS2 spécifiquement au niveau des cellules bêta pancréatiques ou du muscle squelettique ou exprimant SOCS3 spécifiquement au niveau du muscle squelettique. L'entretien de ces 3 lignées nécessite l'utilisation de 174 souris par an, soit 348 souris pour 2 ans. Dans le but de respecter la règle des 3R seulement 2 séries de croisement seront réaliser par an et seuls 4 mâles transgéniques seront conservés pour ces croisements (pour chaque lignée).

L'utilisation de ces modèles animaux pourrait permettre d'apporter des éléments nouveaux quant au rôle des protéines SOCS dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 et permettre la mise en place de nouvelles stratégies préventives contre l'apparition de ces pathologies.

924- Le diabète est la maladie métabolique la plus répandue dans le monde et son évolution pandémique en fait un problème majeur de santé public. Le diabète de type 2, qui représente 90- 95% des patients diabétiques, apparaît lorsque les tissus impliqués dans le maintien de la normoglycémie (foie, tissu adipeux, muscle) ne répondent plus correctement à l'insuline (résistance à l'insuline) et que la production d'insuline par les cellules β pancréatiques est insuffisante. Cette pathologie est étroitement influencée par des facteurs environnementaux comme le vieillissement de la population, sa sédentarisation et sa malnutrition. Le dysfonctionnement des cellules β et leur incapacité à compenser la résistance à l'insuline est une étape décisive dans l'apparition du diabète. Cependant, les évènements moléculaires impliqués dans ce processus restent à être clairement définis. Les cellules β sont regroupées au sein des îlots de Langerhans qui sont des micro-organes richement vascularisés. Cette vascularisation très dense est essentielle au développement et au fonctionnement des îlots de Langerhans et une communication étroite existe entre les cellules endothéliales et les cellules β . L'objectif majeur de notre projet est de déterminer si les produits de glycation altèrent cette relation indispensable au fonctionnement correct du pancréas endocrine. Ces produits de glycation sont synthétisés spontanément par l'organisme suite à l'hyperglycémie, mais sont également apportés par une alimentation inadéquate (riche en sucres, cuisson inappropriée). Ainsi des altérations des cellules endothéliales en réponse aux produits de glycation pourraient être impliquées dans le dysfonctionnement des cellules β et ainsi dans l'apparition du diabète de type 2. Pour la réalisation de ce projet les animaux seront soumis à de fortes doses de produits de glycation (soit en infusion sous-cutanée soit par administration orale) ou à des hyperglycémies transitoires et répétées. Un suivi métabolique chez l'animal intact sera réalisé ainsi qu'une analyse ex-vivo du pancréas endocrine. L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 740 souris de type C57Bl6. Dans le respect des 3R un nombre réduit d'animaux mais permettant une analyse statistique des résultats sera utilisé (n=10 pour chaque groupe).

925- Il s'agit de protocoles d'immunisation sur des caprins adultes. Les animaux reçoivent plusieurs injections de gamma globulines Ig humaines entraînant le développement d'anticorps qui permettent la fabrication de réactifs marqués à la fluorescéine. Les conjugués obtenus à partir des plasmas hyper-immuns sont utilisés pour la révélation, par sérologie, d'anticorps témoins de maladies infectieuses (exemple : toxoplasmose, amibiase, leishmaniose, syphilis, paludisme, etc...) dans une technique d'immunofluorescence indirecte. Il n'existe pas de méthode in-vitro connue à ce jour pour obtenir des anticorps polyclonaux anti-gammaglobulines humaines ayant la spécificité et l'affinité requises. Certains de ces animaux doivent au préalable avoir été rendus tolérants aux IgM humaines dès leur plus jeune âge. L'espèce caprine a été choisie car c'est un modèle répondant bien à ce type d'antigènes. La chèvre est un animal docile permettant, par la technique de la plasmaphérèse, d'obtenir un volume important de sérum hyper-immun avec un faible nombre d'animaux.

Le choix des animaux, les immunogènes et les protocoles ont été définis de manière à minimiser le nombre d'injection et à obtenir la meilleure réponse immunitaire possible. La troupe est constituée de 50 animaux disponibles pour cette production.

926- Le processus d'élimination d'un médicament par l'organisme comprend son métabolisme, c'est-à-dire sa transformation en métabolites par une réaction enzymatique, et son excrétion. Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments par le biais du système biliaire. L'étude de l'élimination biliaire d'un composé permet de mieux décrire les différentes voies d'élimination du composé.

Cette élimination biliaire est mesurée chez le rat conscient par la cathétérisation du canal biliaire permettant de récupérer la bile sécrétée par l'animal afin de doser le composé administré ou ses métabolites et de calculer sa clairance biliaire, c.à.d. la capacité du système biliaire à éliminer ce composé. En parallèle un cathéter est mis en place à des fins de prélèvement sanguin pour suivre les taux de produits au niveau plasmatique. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés des tests acellulaires ou cellulaires sont d'abord réalisés pour sélectionner les composés d'intérêt (test d'efficacité, de sélectivité, de stabilité métabolique,...). Seuls les composés qui correspondent à des critères prédéfinis sont retenus pour être ensuite testés chez le rongeur. La cathétérisation est réalisée chez le rat, rongeur dont la taille du canal est adaptée à la pose d'un cathéter. Lors d'une étude, 4 à 6 animaux sont utilisés pour l'étude d'une dose de composé afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle et pouvoir interpréter les résultats. Des mesures sont prises pour prévenir la douleur lors du réveil (Administration préopératoire d'analgésique) et pour limiter les contraintes lors de l'opération (anesthésie gazeuse pendant toute la durée de l'opération, planche chirurgicale chauffante pour limiter l'hypothermie lors de la chirurgie, gel ophtalmique placé sur chaque œil pour éviter le dessèchement de ceux-ci pendant l'opération).

927- (i) Contexte et objectifs. Le but est de développer de nouvelles formulations galéniques contenant à la fois amphotéricine B et miltéfosine, toutes deux actives vis-à-vis de la leishmaniose viscérale en améliorant leur biodisponibilité et leur efficacité parasiticide. Les formulations actuelles contiennent seulement de l'amphotéricine B (Fungizone® et AmBisome®) et ne peuvent être données que par voie parentérale; de plus la seconde est très chère pour une maladie sévissant surtout dans les pays en voie de développement. L'efficacité des nouvelles formulations sera vérifiée sur le modèle souris mis au point par S. L. Croft, (London School of Tropical Medicine and Hygiène) et sur lequel ont été découverts l'efficacité leishmanicide de la Fungizone® (amphotéricine B déoxycholate), de l'AmBisome® (amphotéricine B) et de l'Impavido® (miltéfosine) qui sont actuellement employés pour traiter les malades. (ii) Résultats attendus. Nous espérons que les formulations permettront un passage de la barrière intestinale à l'amphotéricine B ouvrant ainsi la voie au traitement de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un traitement par voie orale à plus faible coût et d'une administration au malade plus facile. Ce projet utilisera 160 souris femelle Balb/c

928- Ce projet a pour but de tester des ingrédients alimentaires d'origine végétale afin de déterminer leur digestibilité ou leur devenir métabolique (absorption, fermentation colique, défécation ou excrétion). Les différents ingrédients testés sont des ingrédients déjà existants et commercialisés mais dont le procédé a pu être modifié pour des raisons de propriétés technologiques. On souhaite par conséquent vérifier si ces modifications technologiques ont pu entraîner des modifications physiologiques, par exemple en regardant l'influence des certaines fibres ou polyols sur les paramètres de fermentation colique. Ce projet vise aussi à tester le devenir métabolique de certains sucres rares qui sont des isomères d'autres sucres dans l'optique de trouver des sucres à faible pouvoir calorifique. Les effectifs sont fixés de 10 animaux par groupe. D'après la littérature et notre expérience, cet effectif est suffisant et nécessaire pour s'assurer de la significativité des résultats et pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Le devenir métabolique de nouveaux ingrédients fonctionnels est donc étudié au travers de ce projet, aucune technique de remplacement n'est donc possible car des phénomènes physiologiques complexes de digestion et absorption sont nécessaires.

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre d'étudier le devenir métabolique de tout type d'ingrédients : digestibilité, absorption, fermentation colique, excrétion ou défécation. Dans la plupart des cas, il s'agira de tester la fonctionnalité de nos nouveaux ingrédients par rapport à ce qui a été publié sur des ingrédients concurrents ou sur de précédentes versions de nos ingrédients. Ce projet préclinique sur animal nous permettra de vérifier l'efficacité de nos ingrédients malgré des modifications technologiques ainsi que les doses efficaces avant de d'envisager le stade clinique nécessaire à la construction d'un dossier EFSA pour l'obtention d'une allégation santé.

929- Dans certaines affections la perte osseuse est excessivement importante et ne peut cicatriser spontanément à cause de l'éloignement des berges du défaut osseux. Ces pertes de tissu osseux nécessitent une substitution pour conserver l'intégrité et assurer les fonctionnalités mécaniques et biologiques du squelette. Le comblement et la régénération des pertes osseuses est un déficit majeur dans la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, vertébrale ou traumatologique. Actuellement, il existe un éventail très varié de substituts osseux d'origine biologique ou synthétique.

Afin que ces matériaux soient utilisés chez l'homme, ils doivent passer par une série d'évaluation in vivo afin d'être validés et autorisés. De plus, ce type d'étude est exigé par les normes qui visent un développement industriel et à la commercialisation de ces produits. C'est pour ces raisons que des partenaires privés et publics sollicitent le Centre de Recherche et d'Investigation Préclinique CRIP-ONIRIS.

Selon la définition de Hollinger et al, et dans le but de reproduire une perte osseuse qui ne peut cicatriser spontanément appelé « défaut de taille critique », le lapin, le chien et les petits ruminants sont les espèces les plus utilisées comme modèles in vivo. Ces défauts peuvent être situés en zone diaphysaire (défauts segmentaires) soumis à d'importantes sollicitations mécaniques et donc nécessitant une stabilisation chirurgicale par ostéosynthèse, ou en zone métaphyso-épiphyso-saire (défauts cylindriques) sans ostéosynthèse associée. L'utilisation de défaut de taille critique fait partie de la démarche habituelle d'évaluation des substituts osseux. Si les défauts de taille critique

segmentaires (zone diaphysaire) nécessitent des implantations unilatérales, les défauts de taille critique cylindriques (zone métaphyso-épiphysaire) permettent des implantations bilatérales. Aussi, les protocoles de recherche faisant appel à ce type de modèles sont très fréquemment mis œuvre par le CRIP. C'est pourquoi de multiples dossiers mentionnant cette utilisation sont déposés, sur plusieurs espèces animales et pour diverses localisations anatomiques en fonction de l'application clinique finale envisagée.

Il s'agit ici de protocoles répétitifs mis en œuvre plusieurs fois par an, comportant à chaque fois un témoin positif (matériau de référence et/ou autogreffe) et le matériau à évaluer, qu'il s'agisse d'un biomatériau seul ou de composites (biomatériaux combinés avec des cellules, associés ou non à des molécules actives) issus de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Le Projet présenté ici sera réalisé chez le modèle chien, au total 12 animaux seront utilisés. ce projet concerne l'évaluation d'un substitut osseux associé à des molécules actives (facteurs de croissance) pour accélérer la cicatrisation osseuse. L'objectif scientifique de ce projet est de démontrer que ce biomatériau, associant des facteurs de croissance osseuse avec des micrograins de phosphate de calcium biphasique (BCP), permet de combler des pertes de substance osseuses et d'induire une reconstruction osseuse totale et rapide. Ce projet fait suite à une première étude et les résultats seront comparés (témoin positif) à l'étude précédente où les objectifs techniques étaient d'aboutir à la conception d'un dispositif prêt à l'emploi et d'un protocole précis de préparation du biomatériau (BCP + sang), utilisable facilement au bloc opératoire pour le comblement de pertes importantes de substance osseuse de volumes variables.

La reconstruction de ces pertes de substance, évaluée aux plans clinique, radiologique et tomographique constituera le critère de réussite de ce projet.

930- Les thérapies cellulaires, nouveau pan des biotechnologies au service de la santé humaine, utilisent des cellules dans un but thérapeutique. Les termes de "médecine régénératrice" recouvrent depuis quelques années un domaine thérapeutique relativement ancien dont la caractéristique est l'utilisation des produits biologiques à des fins de reconstruction de tissus et d'organes.

Les cellules souches adultes (autologues et hétérologues) sont utilisées depuis plus d'un quart de siècle en thérapie cellulaire, les applications majeures étant la greffe de moelle osseuse (cellules souches hématopoïétiques) et la greffe de feuillet épidermiques reconstitués (cellules souches kératinocytaires). La découverte des cellules souches embryonnaires humaines en 1998, et plus récemment la possibilité de reprogrammer des cellules primaires en cellules pluripotentes, créent des perspectives nouvelles importantes pour la médecine régénératrice. Un protocole de différenciation séquentiel fondé sur la chronobiologie et l'ontogénèse a permis d'isoler une population pure et homogène de kératinocytes capables de reconstituer un épiderme pluristratifié fonctionnel aussi bien in vitro qu'in vivo. Ce protocole permet d'envisager un essai clinique de Phase I dans l'indication du traitement de l'ulcère de jambe drépanocytaire invétéré, qui est en cours de discussion avec Agence Nationale de Sécurité du Médicament.

Pour mener à bien ce projet, une étude préclinique, réglementaire de toxicité cellulaire devra être entreprise sur des animaux.

En effet, les liens entre « l'état de pluripotence » et la tumorigenèse semblent très étroits. Les cellules pluripotentes humaines ont la capacité à former un tératome (tumeur bénigne) lors de greffes chez la souris immunodéficente. Bien que la différenciation des cellules provoque la perte des capacités de prolifération et réduise donc les risques de tumorigenèse, il est cependant difficile d'exclure totalement la présence résiduelle de quelques cellules indifférenciées, d'où un risque théorique d'apparition de tumeur. Ceci soulève des inquiétudes pour l'utilisation des cellules dérivées des cellules souches pluripotentes en thérapie cellulaire. La sécurisation des greffons vis-à-vis de ce risque est donc indispensable pour garantir la sécurité des thérapies cellulaires.

Dans ce projet, une banque de kératinocytes sera réalisée à partir d'une lignée de cellules souches embryonnaires de grade clinique. Les études pré-cliniques décrites ici comprendront trois phases : formation de tératome, biodistribution et greffe d'épiderme reconstruit.

Afin de réduire le nombre d'animaux (mutualisation des groupes pour la biodistribution par exemple) et d'avoir une cohérence expérimentale dans cette partie préclinique, nous avons décidé d'utiliser la même lignée de souris dans toutes les expériences en matière de sécurité précliniques (tératome, biodistribution et greffe). Nous choisissons d'utiliser la souris Nude (Swiss Nude, CrI:NU(lco)-Foxn1nu) pour effectuer cette étude préclinique. Au total, 120 animaux serviront à cette étude réglementaire pour le passage au premier essai chez l'homme.

931- Actuellement les accidents vasculaires cérébraux sont traités à la phase aiguë par l'injection intraveineuse de fibrinolyse (sur le modèle de l'infarctus du myocarde). Cependant, ce seul moyen pharmacologique ne permet de déboucher les vaisseaux cibles que dans 15% des cas pour une carotide, et 40% des cas pour une artère sylvienne, ce qui reste faible. Pour cette raison, de nouveaux dispositifs intracrâniens ont été développés pour permettre l'extraction du thrombus dans les vaisseaux de façon mécanique. Cette nouvelle génération de stents, appelés Stent Retrievers est apparue en 2010 pour l'utilisation cérébrale. Leur utilisation nécessite une courbe d'apprentissage non négligeable, et l'intervention qui doit être rapide pour être efficace nécessite un entraînement préalable. Dans ce but, pour permettre la diffusion de cette technique interventionnelle en France et en Europe nous réalisons dans un but de formation des simulations d'occlusion vasculaire dans plusieurs territoires pour permettre un training quasi-réel de

sénior neuroradiologues interventionnels. La stratégie de formation s'intègre dans un objectif plus large d'amélioration de la prise en charge des AVC au plan national et dans le développement des unités neurovasculaires de référence.

Le modèle choisi est le porcelet car sa taille, son anatomie vasculaire et le diamètre de ses artères sont proches de celle de l'homme et permettent d'utiliser les mêmes cathéters et dispositifs interventionnels, dans les mêmes conditions de diagnostic et de surveillance (radiologie). Les gestes interventionnels peuvent être répétés plusieurs fois sur le même animal, de sorte que deux porcelets permettent la formation de 12 neuroradiologues en une journée. Nous prévoyons 6 formations par an soit, à raison de deux porcelets par session, un total de 36 animaux sur 3 ans.

932- Objectifs : Etudier la faisabilité et la reproductibilité de la mesure de l'élasticité tissulaire du placenta et des principaux organes (foie, poumon, cerveau) chez le fœtus de babouin.

Matériel et Méthodes : L'échographie standard est uniquement morphologique, on pourrait ici s'approcher d'informations fonctionnelles ; si on détermine par exemple l'évolution normale de l'élasticité pulmonaire fœtale pendant la grossesse, ceci pourrait nous permettre d'identifier les situations où cette évolution est pathologique, et donc prédire par exemple une détresse néonatale, une atteinte du développement cérébral, de prédire l'évolution vers un retard de croissance. Vingt babouines gestantes vont être sédâtées et échographiées, à mi-gestation et en dernier tiers de gestation. La gestation de la babouine dure 185 jours, et est détectée environ 1 mois 1/2 après l'ovulation. Deux opérateurs vont procéder indépendamment et en aveugle à des mesures d'élasticité (en kiloPascal ou kPa) sur chaque organe cible (placenta, foie, poumon droit, poumon gauche, noyaux gris centraux, substance blanche périventriculaire cérébrale). Trois mesures successives vont être réalisées par chaque opérateur, au niveau de chaque organe, afin d'étudier la variabilité intra et inter-observateur. Les mesures vont être effectuées à l'aide de régions d'intérêts (ROI) arrondies de 10 mm de diamètre pour le placenta et 5 mm de diamètre pour les autres tissus.

933- Des équipes de recherche expérimentale, dont la nôtre, ont établi qu'il est possible de recourir à la vaccination thérapeutique pour promouvoir et/ou accélérer l'élimination des cellules tumorales si l'on est attentif à la diversité des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs. En effet, certaines de ces cellules peuvent, selon la façon dont elles sont activées, avoir des propriétés pro- ou antitumorales. Il est très important de bien comprendre ces mécanismes pour déterminer les meilleurs adjuvants à utiliser dans un objectif de vaccination antitumorale à visée thérapeutique. C'est l'objectif de ce projet qui nécessite le recours à un organisme entier car il n'est pas encore possible de reproduire la complexité des mécanismes en jeu dans des modèles cellulaires. Nous aurons recours à différentes lignées de souris aux propriétés génétiques variées pour répondre aux questions posées. Ces souris recevront d'une part des cellules tumorales et d'autre part différentes modalités de vaccination dont l'efficacité sera évaluée en mesurant la croissance ou la régression tumorale.

Nous avons estimé à environ 2800 le nombre de souris nécessaire à la réalisation de ce projet sur 5 ans (soit environ 560 par an). Ce nombre a été calculé en réduisant la taille des lots sans pour autant anéantir la puissance biologique et statistique des expériences. En mettant en œuvre des procédures éthiquement approuvées, et en identifiant un ou des point(s) limite(s) le(s) plus précoces possibles, la souffrance des souris sera minimisée. La surveillance régulière des animaux permettra de détecter rapidement toute détérioration de l'état de santé général des souris car de telles souris seront euthanasiées/mises à mort afin d'éviter tout mal-être et toute souffrance.

L'autorisation de ce projet permettra d'apporter des informations essentielles pour le développement de traitements de cancers solides diagnostiqués dans les services de cancérologie

934- Certaines pathologies ou atteintes vestibulaires (Le. névrites vestibulaires, Maladie de Ménière) causent une perte fonctionnelle permanente due aux dommages causés à l'appareil vestibulaire périphérique. Bien que ces déficits vestibulaires durables puissent être, dans une certaine mesure, compensés ou masqués dans la vie de tous les jours, les patients souffrent de problèmes permanents d'équilibre ou d'étourdissement et des handicaps qui augmentent le risque de chutes.

Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles atteintes de l'oreille interne. Nous avons mis en évidence l'efficacité de certaines drogues pour protéger les organes de l'oreille interne (suite à un trauma ou une maladie) démontrant ainsi la possibilité de développer des traitements pour satisfaire ce besoin médical mal connu et qui a de nombreuses implications en santé publique.

Le programme Protection fournira les données précliniques répondant aux exigences réglementaires nécessaires pour le test de nouveaux médicaments en essais cliniques chez des patients. En 3 étapes de tests dans un modèle animal spécifiquement développé pour l'étude des pathologies vestibulaires, nous allons

1/ Déterminer la gamme de dose efficace correcte pour le candidat-médicament phare SENS- 212 avant le début des essais cliniques (phase clinique 1 en 2014),

2/ Sélectionner le meilleur candidat spécifique pour une administration locale

3/ Déterminer la gamme de dose efficace pour le composé sélectionné à l'issue de la phase 2 et SENS-212 pour une administration locale avant l'entrée chez l'homme en 2015.

Chaque candidat-médicament sera testé en comparaison avec le traitement clinique standard actuel (corticostéroïdes) en conditions aveugles randomisées.

935- Les cancers des Voies Aéro Digestives Supérieures (VADS) constituent un enjeu majeur de santé publique car ils représentent 10% de l'ensemble des cancers en France. 60% d'entre eux ne sont diagnostiqués qu'à un stade avancé (III ou IV) avec un taux de survie à 5 ans ne dépassant pas 50% durant laquelle la qualité de vie des patients est considérablement dégradée. Ces taux de survie médiocres, principalement dus à de nombreuses récurrences locales, n'ont pas beaucoup évolué au cours des 3 dernières décennies en dépit d'avancées technologiques et biologiques innovantes (radio-chimiothérapies, thérapies ciblées ...). De plus, ces traitements n'ont pour l'instant ni permis d'améliorer le taux de survie de façon significative ni amélioré les conditions de vie des patients qui souffrent toujours des nombreux effets secondaires (nausées, vomissements, diarrhées, toxicité des muqueuses, inflammation ...) associés aux traitements. La validation de protocoles thérapeutiques résultant de nouvelles associations demeure donc un challenge permanent pour le traitement des cancers des VADS.

La radio(chimio)résistance des cancers de VADS est, pour sa plus grande part, liée à une inhibition aberrante de l'apoptose à laquelle contribue largement la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. L'objectif de ce projet est de valider une nouvelle stratégie ciblant spécifiquement la mitochondrie grâce à l'utilisation combinée de molécules BH3-mimétiques (ABT737), de cisplatine et d'une irradiation photonique dans le but de générer un stress oxydant intra mitochondrial majeur dont les effets délétères sur sa structure et son fonctionnement seront irréversibles, y compris sur les cellules souches cancéreuses. Nous espérons en outre mettre en évidence des synergies entre ces traitements, synergies qui permettront de diminuer les doses de cisplatine utilisées, donc sa toxicité et les effets secondaires associés. Après avoir démontré le potentiel de cette association thérapeutique in vitro, l'objectif de la présente demande est de le valider in vivo sur des souris xénotransplantées à l'aide de cellules tumorales humaines issues de cancers des VADS avancés (donc résistants) afin d'en évaluer la toxicité potentielle ainsi que l'efficacité thérapeutique réelle. Ce travail constitue un prérequis incontournable à une étude clinique de phase 1 chez l'homme.

Compte-tenu de notre expérience passée en la matière, le modèle souris immuno-déprimées et xénotransplantées sur la patte arrière nous apparaît comme étant pertinent pour l'objectif recherché. Le nombre d'animaux (80) est calculé à minima par rapport à l'effectif nécessaire pour une exploitation statistique des résultats (test de Mann et Whitney). Les points limites de l'expérimentation, prédictifs d'une souffrance potentielle des animaux, ont été fixés à une valeur de 20% de perte de poids corporel et d'une taille limite de 1200 mm³ du volume tumoral. Toute modification comportementale suspecte (prostration, perte de motricité liée au volume tumoral) ou toute apparition d'ulcération au niveau de la tumeur constitueront un motif d'interruption de l'expérimentation.

936- La fibrose systémique néphrogénique (FSN), initialement identifiée en 1997 chez des patients dialysés, a été décrite pour la première fois en 2000 sous le nom de dermatopathie fibrosante néphrogénique, suite aux manifestations cutanées uniquement observées dans un premier temps. Ce n'est qu'en 2003 que son caractère systémique a été reconnu et a amené à une modification de son nom.

Cette pathologie est observée exclusivement chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique sévère ou terminale et très majoritairement chez des patients dialysés. Cette maladie rare et très invalidante se caractérise notamment par un épaississement et un durcissement cutanés associés à la formation de papules érythémateuses pouvant confluer en plaques brunâtres avec un aspect en « peau d'orange ». Les patients développent très fréquemment des contractures articulaires qui les confinent progressivement au fauteuil roulant. Ils souffrent fréquemment de prurit, de causalgies et de douleurs aiguës. Le diagnostic de la FSN se fonde sur les éléments cliniques et sur l'histopathologie, selon un système de score.

Il n'existe pas de traitement reconnu pour la FSN. La transplantation rénale semble être l'option thérapeutique la plus généralement admise à ce jour. En 2006, deux équipes européennes ont, de manière indépendante, suggéré l'existence d'un lien entre l'administration d'un produit de contraste à base de gadolinium, utilisé comme agent de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la survenue d'une FSN chez des patients insuffisants rénaux. Le lien entre les chélates de gadolinium (CG) et la maladie est désormais considéré comme hautement probable par les autorités de santé et la communauté scientifique. La physiopathologie de cette maladie reste mal connue, notamment par manque de modèles précliniques pertinents.

L'objectif général du projet est de mieux comprendre le rôle des CG dans le mécanisme de cette maladie.

Il est nécessaire de recourir à un modèle animal afin, a) de tenir compte du caractère systémique (différents organes touchés) de cette pathologie ; b) d'intégrer l'implication de plusieurs systèmes biologiques dans la réponse toxique aux CGs, et enfin, c) d'inclure la composante pharmacocinétique consécutive à la rétention du CG chez l'animal insuffisant rénal. Ces études seront réalisées chez le Rat dans un but de cohérence avec la littérature.

L'expérience du centre expérimental ainsi que les compétences et expériences des intervenants/expérimentateurs dans ces différentes procédures et en expérimentation animale garantissent une prise en charge optimale du bien-être de l'animal. Des études préliminaires (de faisabilité ou de preuve de concept) sont réalisées afin de réduire le nombre d'animaux pour les études ultérieures et d'obtenir les conditions optimales d'étude (raffinement des procédures). Dans le cadre de ce projet d'une durée de 5 ans, un total de 560 animaux (rats) sera utilisé.

937- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare (prévalence de 15 à 50 par million), à l'origine d'une défaillance cardiaque droite. La physiopathologie de l'HTAP implique un remodelage des petites artères pulmonaires, selon un processus complexe et multifactoriel. L'inflammation, l'infiltration par des cellules immunitaires, la dysfonction endothéliale, et l'acquisition d'un phénotype proliférant des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires jouent un rôle dans les modifications structurales du lit vasculaire pulmonaire. Malgré les progrès récents dans la prise en charge thérapeutique, centrée essentiellement sur la correction de la dysfonction endothéliale, il n'existe aucun traitement curatif et la majorité des patients meurent s'ils ne bénéficient pas d'une transplantation cardio-pulmonaire dans les 5 ans après le diagnostic. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques complexes de l'HTAP est donc nécessaire pour le développement de nouveaux traitements et améliorer la survie des patients. En effet le pronostic de l'HTAP du groupe 1 est de l'ordre de 60% à 3 ans dans les formes incidentes de la maladie.

Plusieurs acteurs entrent en jeu au cours de l'HTAP : cellules endothéliales et cellules musculaires lisses constituant les artères pulmonaires, cellules inflammatoires et enfin cellules cardiaques. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces types cellulaires, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique ou pathologique.

Les modèles animaux d'hypertension pulmonaire (HTP) sont des outils très importants qui permettent le suivi de la mise en place des différents mécanismes physiopathologiques de la maladie dans le temps.

En effet, l'accès à différents stades de la maladie est possible lorsque les animaux sont étudiés à différents stades de l'HTP induite. Ceci n'est pas possible chez l'Homme puisque les patients ne sont diagnostiqués qu'à un stade tardif très avancé de la maladie. La compréhension de ses mécanismes est nécessaire pour la mise en place de meilleurs moyens de dépistages ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées.

Notre équipe étudie le rôle du récepteur NMDA dans le développement de l'HTAP : récepteur présent sur les différents types cellulaires impliqués dans le développement de l'HTAP mais aussi de nombreux autres types cellulaires. Sur la base de résultats préliminaires, il apparaît nécessaire d'identifier le rôle de ce récepteur sur les différents types cellulaires impliqués dans le développement de la pathologie. Cela permettrait, de déterminer quelle(s) cellule(s) cibler en priorité par une molécule thérapeutique bloqueur du récepteur NMDA afin d'accroître son efficacité thérapeutique tout en diminuant ses effets indésirables, rendant possible son utilisation chez l'homme, de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliquant le récepteur NMDA dans le développement de l'HTAP apportant ainsi un mécanisme d'action pour cette molécule thérapeutique.

938- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare (prévalence de 15 à 50 par million), à l'origine d'une défaillance cardiaque droite. La physiopathologie de l'HTAP implique un remodelage des petites artères pulmonaires, selon un processus complexe et multifactoriel. L'inflammation, l'infiltration par des cellules immunitaires, la dysfonction endothéliale, et l'acquisition d'un phénotype proliférant des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires jouent un rôle dans les modifications structurales du lit vasculaire pulmonaire. Malgré les progrès récents dans la prise en charge thérapeutique, centrée essentiellement sur la correction de la dysfonction endothéliale, il n'existe aucun traitement curatif et la majorité des patients meurent s'ils ne bénéficient pas d'une transplantation cardio-pulmonaire dans les 5 ans après le diagnostic. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques complexes de l'HTAP est donc nécessaire pour le développement de nouveaux traitements et améliorer la survie des patients. En effet le pronostic de l'HTAP du groupe 1 est de l'ordre de 60% à 3 ans dans les formes incidentes de la maladie.

Les modèles animaux d'hypertension pulmonaire (HTP) sont des outils très importants qui permettent le suivi de la mise en place des différents mécanismes physiopathologiques de la maladie dans le temps.

En effet, l'accès à différents stades de la maladie est possible lorsque les animaux sont étudiés à différents stades de l'HTP induite. Ceci n'est pas possible chez l'Homme puisque les patients ne sont diagnostiqués qu'à un stade tardif très avancé de la maladie. La compréhension de ces mécanismes est nécessaire pour la mise en place de meilleurs moyens de dépistages ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées.

939- L'athérosclérose est la principale origine des infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux, et l'hypertension artérielle en est un facteur de risque majeur. L'athérosclérose correspond à un processus d'inflammation chronique, initié par l'accumulation de lymphocytes T et de macrophages au niveau de la paroi vasculaire. L'endothélium est un élément important du trafic des leucocytes entre le flux sanguin, la paroi artérielle et l'espace extracellulaire. Les protéines Rho, dont RhoA, interviennent dans de multiples étapes de ce processus et l'inhibition de l'effecteur de RhoA, Rho kinase, réduit l'athérosclérose.

L'angiotensine II (Ang II), facteur majeur de la régulation de la pression artérielle et de l'hypertension, participe également aux mécanismes d'inflammation. La stimulation des récepteurs AT1 par l'Ang II provoque une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (I-CAM, V-CAM, E- et L-sélectines) et des intégrines à la surface des cellules endothéliales, des leucocytes et des plaquettes. L'Ang II, par une action directe sur les leucocytes ou par la production de cytokines proinflammatoires contribue aux atteintes tissulaires associées à l'hypertension. Nous avons récemment démontré que le facteur d'échange Arhgef1 est responsable de l'activation de RhoA par l'Ang II et le récepteur AT1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Arhgef1 est également activé par l'Ang II dans les

leucocytes (humains et de souris). L'activation d'Arhgef1 par l'Ang II est dépendante de sa phosphorylation par la kinase Jak2 activée par le récepteur AT1. Cette voie de signalisation peut également être activée par différentes cytokines.

Ce projet consiste en analyser, par des approches in vitro et in vivo, l'implication d'Arhgef1 dans l'inflammation, le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans la paroi vasculaire en particulier en réponse à l'Ang II. A terme, l'objectif est de montrer qu'en plus de l'effet antihypertenseur, l'inhibition d'Arhgef1 pourrait être efficace contre l'athérosclérose.

940- Les anthracyclines, drogues majeures dans le traitement des cancers de l'enfant, présentent comme principal effet secondaire une cardiotoxicité. La surveillance cardiaque est donc indispensable pour détecter des altérations de la fonction myocardique et pour optimiser la prise en charge des patients. La mesure de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) par l'échocardiographie trans-thoracique est la méthode la plus utilisée. Mais elle ne permet pas une détection précoce infra clinique de l'atteinte cardiaque. De plus, il n'existe pas de biomarqueurs cardiaques permettant le dépistage de la toxicité débutante. Ainsi, il n'existe à ce jour aucun marqueur précoce pouvant prédire la survenue ultérieure d'une cardiomyopathie aux anthracyclines.

Parmi les nouvelles techniques échocardiographiques, l'analyse de la fonction myocardique en "Speckle Tracking" (suivi de pixel) semble prometteuse. Elle analyse le déplacement myocardique par la détection automatique (tracking) de marqueurs acoustiques naturels (speckles) au sein de l'image ultrasonique bidimensionnelle. Elle permet une analyse dynamique régionalisée mais globale de la contractilité myocardique. Autrement dit, elle permet une évaluation rapide, précise et objective de la fonction ventriculaire segmentaire et globale. Par ailleurs, des travaux préliminaires montrent l'intérêt du Speckle Tracking comme outil de diagnostic précoce de dysfonctions contractiles indétectables en échocardiographie conventionnelle comme la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG).

L'objectif de ce travail est donc de déterminer si le Speckle Tracking peut être un marqueur prédictif d'une dysfonction myocardique évoluant inéluctablement vers une insuffisance cardiaque.

Un suivi longitudinal des paramètres Speckle Tracking de la fonction cardiaque sera donc effectué chez le rat Wistar jeune sain traité par anthracyclines versus contrôle. Les rats, divisés en plusieurs groupes, recevront des doses cumulatives de Doxorubicine différentes (trois doses) afin de moduler le niveau de cardiotoxicité et le développement potentiel d'insuffisance cardiaque (4 groupes de 10 rats dont 1 groupe contrôle). Pour la dose la plus élevée, les analyses in vivo échocardiographiques seront complétées par des analyses biochimiques/histologiques (n=5 animaux par groupe minimum) et des analyses de la fonction contractiles au niveau de la cellule isolée (n=5 animaux par groupe minimum). L'objectif est de comparer les propriétés fonctionnelles de cardiomyocytes issus de zones « altérées » déterminées par échocardiographie avec celles de cardiomyocytes issus de zones du territoire myocardique dont la déformation est normale. La validation de ces hypothèses sera effectuée par des expériences utilisant des molécules cardioprotectrices connues pour prévenir la toxicité des anthracyclines telles que le cardioxane (4 groupes de 10 rats dont 1 groupe contrôle).

941- Notre organisme est en permanence soumis à des agressions environnementales : pollution, rayonnements, stress.... Ces facteurs génèrent un stress oxydant qui est à l'origine du vieillissement normal mais qui pourrait également favoriser la survenue des maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer. Afin de tester cette hypothèse, nous utilisons un modèle animal présentant un stress oxydant élevé de manière chronique, et nous souhaitons déterminer si cela est associé à une apparition plus précoce ou à une forme plus sévère de la maladie d'Alzheimer. Dans ce projet et c'est notre conduite de base, tous les efforts sont faits pour réduire le nombre d'animaux par groupe tout en assurant la fiabilité des résultats en termes statistiques. Dans cette étude, 20 groupes de 10 animaux chacun seront utilisés afin de répondre à cette exigence.

942- La neurogenèse du bulbe olfactif représente un modèle principal pour étudier les différents aspects de la génération des neurones tels que la biologie des cellules souches, la détermination neuronale, la migration et la différenciation cellulaire. De plus, le bulbe olfactif est un des 2 seuls territoires du cerveau où de nouveaux neurones sont produits continuellement au stade adulte chez les mammifères. Enfin, il présente un potentiel intéressant pour des approches de thérapie cellulaire dans des modèles de maladies neurodégénératives. L'objectif de ce projet est de déterminer les mécanismes moléculaires qui contrôlent les différentes étapes de la neurogenèse et donc d'identifier des gènes impliqués dans ces processus et de tester leur fonction in vivo dans le cerveau de souris, c'est à dire en condition physiologique. La neurogenèse est un processus qui dépend de l'environnement cellulaire dans le tissu nerveux et de l'environnement olfactif dans lequel évolue l'animal. L'ensemble de ces critères fait qu'il est indispensable d'étudier ce processus in vivo chez l'animal. L'étude de la neurogenèse adulte est un champ de recherche assez récent qui a pâti d'un manque d'approches expérimentales concernant l'aspect génétique et moléculaire. Dans ce contexte, notre équipe a mis au point en 2008 une approche simple, rapide et indolore qui permet de modifier l'information génétique des cellules souches directement dans le cerveau de souris nouveau-nés. Grâce à cette méthode, nous pouvons étudier la fonction de plusieurs gènes différents sans produire d'animaux transgéniques par les méthodes classiques et par conséquent en limitant le nombre d'animaux nécessaires à cette

étude. Enfin, par une approche de transplantation cellulaire, nous pouvons étudier le destin de cellules souches greffées dans le cerveau d'animaux transgéniques adultes afin de savoir si l'absence d'un gène peut être délétère pour l'intégration des nouveaux neurones et donc pour la plasticité neuronale. Le nombre d'animaux nouveau-nés (1000) et adultes (48) est de plus réduit au strict nécessaire grâce à une analyse statistique des résultats obtenus

943- La découverte de nouveaux traitements pour la maladie d'Alzheimer (MA) est un des enjeux socio-économiques majeurs et un challenge primordial pour les industriels de la pharmacie. Notre société de biotechnologie développe des programmes de R&D en interne et en collaboration dans le but de valider des stratégies thérapeutiques innovantes pour la MA. Un de ces projets est réalisé en collaboration avec une société de biotechnologie européenne qui souhaite caractériser un composé candidat-médicament (CCM) pour la MA.

Dans ce programme, notre société doit réaliser les preuves de concept de l'efficacité du CCM dans des modèles murins de MA. Pour atteindre ces objectifs, notre société utilise des modèles cellulaires et animaux de la MA. Parmi ces modèles, nous utilisons un modèle murin transgénique de la MA, les souris Tg2576. Les souris Tg2576 surexpriment une forme humaine mutée de la protéine APP et développent en fonction du temps certains symptômes de la MA dont des troubles cognitifs associés à des pertes synaptiques et des dépôts amyloïdes caractéristiques de la pathologie humaine.

Le présent projet a pour objectif de démontrer l'efficacité thérapeutique d'un CCM (appelé CCM1 pour des raisons de confidentialité) dans les souris Tg2576 à travers une étude dose-réponse. Pour ce faire, les souris seront commandées et réceptionnées à l'âge de 3 mois. Les souris seront hébergées jusqu'à ce qu'elles atteignent l'âge de 8 mois. À l'âge de 8 mois, les souris recevront des doses croissantes de composé CCM1 administré par gavage une fois par jour durant 21 jours. Durant cette période, les capacités cognitives des animaux seront mesurées dans plusieurs paradigmes comportementaux. À la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort pour analyses des tissus cérébraux. Un protocole identique sera réalisé sur des souris non-transgéniques « témoins » (wild-type littermate).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 125 souris Tg2576 males réparties en 5 groupes expérimentaux comprenant 25 souris, et de 75 souris non-transgéniques « témoins » réparties en 3 groupes de 25 souris. Le nombre d'animaux par groupe est optimisé en accord avec des études antérieures afin d'assurer une exploitation statistique correcte des études comportementales. Les analyses histopathologiques cellulaires et biochimiques seront faites sur ces mêmes animaux. Dès réception et tout au long de l'étude, les animaux seront surveillés deux fois par jour afin de vérifier l'état général des animaux, la présence d'une perte de poids excessive (+ de 10 % du poids initial), l'arrêt de la prise alimentaire solide et l'apparition de tremblements, la prostration, la diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs, les diarrhées prolongées, l'hypothermie prolongée, la pilo-érection, la respiration anormale et l'absence de toilettage. Pendant la période d'administration du composé CCM, les animaux seront particulièrement surveillés. Le composé à tester a déjà fait l'objet d'une étude toxicologique et n'a montré aucun signe de toxicité aux doses utilisées dans l'étude.

944- Le but de ce projet est de transformer le fond génétique hétérogène d'une lignée de souris génétiquement modifiée sur un fond génétique pure.

Dans le cadre de nos travaux sur la dystrophie musculaire causée par des mutations d'un gène codant une protéine nucléaire, notre équipe a développé un modèle murin (souris) génétiquement modifié portant une mutation ponctuelle décrite chez des patients atteints de cette pathologie. Ce modèle murin obtenu sur un fond génétique mixte récapitule la pathologie humaine et plus particulièrement le phénotype du muscle squelettique et cardiaque. L'utilisation de ce modèle nous permet de disséquer les mécanismes moléculaires, les voies de signalisations impliquées dans l'apparition du phénotype mais aussi d'étudier la physiologie du muscle squelettique et cardiaque. L'ensemble de ces travaux ayant pour but de mieux comprendre cette pathologie et de concevoir des approches thérapeutiques innovantes ; thérapies géniques et/ou cellulaires mais aussi pharmacologiques. Les procédures expérimentales utilisées à ces fins seront décrites dans des demandes d'autorisations spécifiques, celle-ci concernant uniquement le passage de notre lignée génétiquement modifiée sur un fond génétique pure. Ce projet nous permettra d'homogénéiser le fond génétique sur celui communément utilisé dans d'autres laboratoires de recherche. L'intérêt majeur de ce projet est de pouvoir in fine déterminer l'impact de la mutation d'intérêt sur le développement du phénotype du muscle cardiaque et squelettique en comparaison avec d'autres modèles indépendamment du fond génétique.

Ce projet utilise des souris *mus musculus*. Le nombre d'animaux nécessaire pour mener à bien ce projet est évalué à 176. Les souris sont stabulées sur des portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et nourriture à volonté. Le nombre de souris par cage est fixé à 1 souris pour 600 cm².

Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (les lumières s'allument automatiquement à 6h du matin et s'éteignent le soir à 18h). Le milieu est enrichi avec du woodwools ou du coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris.

945- But général de l'étude : La biocompatibilité oculaire et le confort d'utilisation des lentilles de contact sont influencés par le type de lentille, mais aussi par leur solution de décontamination multifonction. Les composants de la solution absorbés (voire adsorbés) dans la lentille peuvent avoir un impact sur les cellules cornéennes qui reste mal connu.

Objectifs spécifiques : Evaluer sur le lapin (*Oryctolagus cuniculus*) par une analyse métabolomique l'influence sur les cellules cornéennes d'une part (groupe 1, soit 10 lapins), le port de la lentille seule (soit prélevée de sa solution de conservation dans le cas de lentilles jetables) et d'autre part (groupe 2, soit 10 lapins), le port de la lentille après avoir baignée dans la solution de décontamination (le cas des lentilles ré-utilisables). Au total, et avec 3 lapins contrôle, il est prévu de mettre 23 lapins en expérimentation.

946- La nécessité d'évaluer la sécurité des médicaments est apparue suite aux accidents thérapeutiques du début du XXème siècle voire aux tragédies comme ce fut le cas pour la thalidomide.

Dans ce cadre, l'étude de l'index thérapeutique et de l'innocuité d'une molécule est primordiale. Il s'agit de déterminer les doses à administrer afin d'obtenir la concentration sanguine permettant l'effet recherché mais également d'évaluer la dose à laquelle les premiers effets secondaires apparaissent. Ces études sont fréquemment réalisées sur des rongeurs. La détermination des paramètres pharmacocinétiques (temps nécessaire pour atteindre le pic plasmatique, temps de demi-vie, cinétique d'élimination du composé,...) est réalisée sur des prélèvements sanguins effectués à différents temps après l'administration du composé. Il est également possible de déterminer la concentration d'une molécule dans son organe cible. La recherche de la dose maximale tolérée se fait en administrant un composé à une dose supérieure à la dose thérapeutique et en surveillant certains paramètres physiologiques comme la prise de poids, la température, la prise alimentaire ou l'apparition de douleur.

En règle générale, un plan d'étude comporte 4 animaux par groupe afin d'assurer un résultat statistique satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 250 souris et 1000 rats est envisagée.

947- La dermatite de contact allergique pose un problème de santé publique. En effet, elle touche 15 à 20% de la population dans les pays industrialisés et concerne 20% des maladies professionnelles (coiffeurs, employé de la cimenterie, infirmière...). C'est une réaction inflammatoire cutanée résultant de l'exposition à des substances allergènes appelées haptènes. On recense actuellement jusqu'à 4000 molécules potentiellement allergisantes. Les seuls traitements disponibles sont les médicaments à base de corticostéroïdes dont on connaît les effets secondaires sur le long terme (effet diabétogènes, immuno-dépresseurs, effets sur le squelette, ulcère de l'estomac, inflammation du pancréas, infection du colon). Les voies de recherche actuelle portent sur le développement de nouveaux médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens.

Les modèles animaux de dermatite de contact ont permis d'éclaircir une partie des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Dans ces modèles, la mesure de la réaction cutanée chez le rat ou la souris après application d'un agent allergisant est un modèle standard validé par la communauté scientifique. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 3000 rats est envisagée.

948- L'anxiété affecte 15-25% de la population dans les pays développés et constitue un problème majeur de santé publique. Parmi les médicaments les plus fréquemment utilisés, on peut citer le Valium, le Prozac, le Buspar et le Zoloft. Cependant les thérapeutiques actuelles présentent des effets secondaires majeurs. Par exemple, le Valium entraîne des troubles de la mémoire, une somnolence, une addiction ainsi qu'un syndrome de sevrage. Ainsi, la recherche de nouveaux médicaments sans les effets notoires des anxiolytiques actuels reste un défi. Les modèles basés sur l'analyse du comportement de rats ou de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles anxieux et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10-20 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2500 souris et 1000 rats est envisagée.

949- La Maladie d'Alzheimer est la 4ème cause de mortalité en France. Elle touche 5% de la population âgée de plus de 65 ans et 15% de la population des personnes de plus de 85 ans. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions cognitives et notamment de la mémoire. Elle conduit à un état de démence qui est extrêmement destructeur pour les patients et leurs familles et qui représente un coût très élevé pour la société. Les causes de la maladie demeurent mal connues et il n'existe à ce jour aucun traitement qui stoppe la progression de cette maladie. Seulement 4 médicaments sont indiqués dans la maladie d'Alzheimer et ils traitent principalement les troubles de mémoire. La recherche sert à améliorer les connaissances fondamentales sur les désordres moléculaires et cellulaires conduisant à la maladie et aux démences apparentées, sur les causes et déterminants possibles de ces maladies, et sur cibles potentielles pour une intervention thérapeutique. Un des modèles animaux (rat ou souris) le plus utilisé dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer est basé sur l'induction et le développement de dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau. Ces dépôts rappellent les plaques séniles

des patients atteints de maladie d'Alzheimer et sont responsables de troubles mnésiques chez l'animal. D'autres modèles animaux miment les lésions des différents centres nerveux chez les patients Alzheimer afin d'induire la déficience mnésique chez l'animal. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

950- L'épilepsie affecte 1 à 2 % de la population. Elle se manifeste par des crises de natures variées (pertes de connaissance brusques, troubles du comportement, difficultés à s'exprimer, troubles de la vision, mouvements anormaux, etc) liées à une hyperactivité anormale du cerveau. Les symptômes dépendent de la région du cerveau touchée par la maladie. Les antiépileptiques, aussi appelés anticonvulsifs, sont des médicaments dont l'action est purement symptomatique (non curative) et vise à diminuer ou à supprimer la fréquence des crises. Malgré l'existence des antiépileptiques, le taux de mortalité est de deux à trois fois plus élevé chez les personnes atteintes d'épilepsie que dans la population en général. Cela est dû aux problèmes sous-jacents qui causent l'épilepsie et aux effets associés aux crises récurrentes. De surcroît, 30 % des patients ne répondent pas aux médicaments actuellement disponibles; il est donc impossible de contrôler leurs crises. La recherche sur l'épilepsie comporte deux grands axes de recherches: la physiopathologie, qui doit être mieux comprise, et le développement de nouvelle thérapeutique plus efficace, voire capable de guérir la maladie. Les modèles animaux demeurent indispensables dans la recherche sur l'épilepsie au vu de la complexité de cette maladie. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 500 souris est envisagée.

951- Selon les études épidémiologiques, le taux de personne atteinte de dépression dans la population française est d'environ 15%. Il a été établi qu'en l'absence de traitement, 15% des patients succombent à la suite d'un suicide et qu'entre 60% et 80% des suicides (entre 10000 et 15000 par an en France) sont le fait d'individus porteurs d'un diagnostic de dépression. Dans 50% des cas, la maladie résiste aux traitements médicamenteux. De plus, les médicaments utilisés dans les traitements de la dépression ont des effets secondaires majeurs qui conduisent souvent à l'arrêt du traitement. Ainsi, la recherche dans le contexte des troubles dépressifs consiste d'une part à cerner les mécanismes sous-jacents de la maladie et d'autre part à trouver des médicaments efficaces sans effets secondaires majeurs. Les modèles basés sur l'analyse du comportement de rats ou de souris demeurent à l'heure actuelle les plus pertinents et les seuls validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des troubles dépressifs et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements, pharmacologiques ou comportementaux. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10-15 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1000 souris est envisagée.

952- La neuropathie est la complication la plus fréquente du diabète; sa prévalence peut atteindre 60 % selon certaines études. On estime que 30% des patients présentant une neuropathie liée à leur diabète n'ont aucun symptôme alors que les 70% restants ressentent un ou plusieurs symptômes. Ces symptômes sont un engourdissement et une faiblesse musculaire au niveau des membres, des picotements et/ou des sensations de brûlure dans les mains et dans les pieds; des chocs électriques douloureux; une extrême sensibilité de la peau, semblable à un coup de soleil douloureux. Dans certains cas, les troubles sensoriels peuvent aussi se manifester par une hyposensibilité qui peut avoir comme conséquence un retard de prise en charge de plaies du pied.

L'hyperglycémie provoque une neuropathie diabétique par une atteinte des nerfs périphériques. Le traitement de la neuropathie se résume à un traitement palliatif car aucun médicament n'est capable de guérir les lésions nerveuses. La recherche dans le domaine de la neuropathie diabétique comporte ainsi 2 axes principaux : d'une part, trouver de nouveaux médicaments afin d'améliorer la prise en charge de la douleur et d'autre part découvrir des traitements capables de restaurer la fonction et la structure du nerf altéré.

L'induction du diabète chez l'animal suivi de l'apparition secondaire d'une neuropathie a été largement étudiée et est décrite comme étant une physiopathologie comparable à la neuropathie des patients diabétiques. La neuropathie diabétique est induite chez le rat ou la souris après administration de Streptozotocin, un antibiotique toxique pour les cellules productrices d'insuline du pancréas. La disparition de ces cellules entraîne une diminution du taux d'insuline dans le sang et conduit à une hyperglycémie. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

953- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie des tissus mous (ex : mèches de renforcement ou de réparation des tissus mous, produits hémostatiques ...). Les porcins, les petits ruminants, les rongeurs (rats) et lagomorphes sont alors des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 370 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les rongeurs, lagomorphes et porcins, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes et porcins et un bedding épais (copeaux) est disposé au fond des cages des rongeurs. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

954- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie cardiovasculaire (ex : stent, réparation ou remplacement de valve cardiaque ...). Les porcins et les petits ruminants sont alors des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain. Les lagomorphes peuvent aussi être utilisés dans certains cas particuliers. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 290 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les petits ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les lagomorphes et porcins, des

contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments et des jouets sont disponibles. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

955- Le présent projet vise à développer une approche multidisciplinaire (éthologie, psychologie et neuroscience non invasive) pour étudier les continuités potentielles entre le système de communication gestuelle des babouins olive *Papio anubis* hébergés en semi-liberté en groupes sociaux et certaines propriétés du langage comme l'intentionnalité, les capacités référentielles et la spécialisation hémisphérique à gauche du cerveau. Dans cette perspective comparative entre primates humains et non-humains portant sur les origines du langage, nous étudierons les propriétés et les asymétries des comportements gestuels de 106 babouins ainsi que leurs corrélats neuroanatomiques à travers (1) des observations éthologiques, (2) des tâches manuelles et gestuelles proposées aux sujets dans leur groupe social et (3) des acquisitions d'images cérébrales anatomiques grâce à la technique non invasive de l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

956- L'importance de la rythmicité circadienne dans la santé humaine et le bien-être est de mieux en mieux caractérisée. Les perturbations des fonctions circadiennes sont connues pour entraîner des troubles métaboliques (obésité, diabète), des problèmes cardiovasculaires, et même certains cancers (par ex., cancer du sein chez les femmes en travail posté). La conception de stratégies pour traiter, prévenir ou retarder ces perturbations est un nouveau défi pour la science et la médecine. La plupart des connaissances en chronobiologie a été obtenue chez les rongeurs nocturnes (c'est-à-rats, souris et hamsters). Compte-tenu de la nature diurne de la vie humaine, ces données ne peuvent pas être appliquées directement dans un contexte biomédical.

Les études des systèmes circadiens et métaboliques, menées chez les espèces nocturnes, ont révélé que ces systèmes sont étroitement intriqués les uns dans les autres, et que leurs dysfonctionnements sont pathogènes à long terme. Comprendre comment fonctionnent ces régulations dans un modèle diurne est donc une condition sine qua non pour des applications appropriées chronothérapeutique chez l'homme.

Pour mieux connaître les différences entre espèces diurnes et nocturnes, une part de nos investigations sera basée sur une comparaison des régulations entre rongeurs diurnes et nocturnes. Cependant, comprendre les bases neuronales du comportement diurne ne peut pas se limiter à une approche *in vitro*, et nécessite une approche *in vivo*.

Le nombre d'animaux proposé ($n=6$ par traitement (témoin vs. traité) et par point-horaire) est basé sur une évaluation de la puissance statistique qui prend en compte les moyennes et la dispersion des données comportementales et moléculaires recueillies dans des études antérieures. Les protocoles longitudinaux permettront de réduire le nombre d'animaux et d'augmenter la puissance statistique en incluant le facteur individuel (ANOVA à mesures répétées, car plusieurs données seront obtenues à partir des mêmes animaux). Lorsque les conditions expérimentales le permettent, les animaux seront traités deux, voire trois fois, à au moins deux semaines d'intervalles pour les injections.

L'ensemble des cinq procédures impliqueront 220 rats roussards et 76 rats Wistar (Procédure n°1, $n = 48$ rats roussards ; Procédure n°2, $n = 48$ rats roussards ; Procédure n°3, $n = 48$ rats roussards ; Procédure n°4, $n = 36$ rats roussards et 36 rats Wistar ; Procédure n°5, $n = 40$ rats roussards et 40 rats Wistar).

957- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en chirurgie maxillo-faciale (ex : implants / substitut osseux dentaires...). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent d'assurer ces évaluations sur des modèles animaux, les espèces porcines et canines sont les modèles de référence en chirurgie dentaire. Les petits ruminants peuvent également être utilisés dans des cas particuliers de chirurgie maxillo-faciale.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 190 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgesie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur (en dehors des périodes d'intervention et des périodes post-opératoires). Concernant les porcins, les lagomorphes et les chiens, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles pour les lagomorphes, les chiens et porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

958- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une réintervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de méthodes alternatives in vitro: tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés en ophtalmologie (ex : implants oculaires). Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les lagomorphes sont le modèle privilégié étant donné les similitudes reconnues avec l'homme.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 50 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgesie). Par ailleurs, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la structure des compartiments. Des jouets sont disponibles dans les cages et de la musique est diffusée en salle d'hébergement. Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

959- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement de ces produits s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre société est fortement engagée dans le développement de

méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Dans ce projet, il s'agit principalement d'évaluer la performance de produits de santé utilisés pour la cicatrisation des plaies cutanées. Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'en assurer sur des modèles animaux, les porcins et les rongeurs (rats, cobayes, souris) sont des modèles privilégiés étant donné les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 650 souris, 500 cobayes, 500 rats et 250 porcins.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études, la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les cobayes et souris sont hébergés en groupes sociaux harmonieux ; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont dans tous les cas maintenus grâce à la structure des compartiments. Les rats disposent d'un bedding épais (copeaux) et des jouets sont disponibles pour les porcins. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

960- Les Travaux Pratiques de la Licence 3^{ème} Année de Sciences du Vivant du module de spécialité Physiologie Des Fonctions Végétatives visent à illustrer les enseignements théoriques portant sur les régulations nerveuse et hormonale du système excréteur, cardiovasculaire, respiratoire et digestif. L'objectif des manipulations réalisées est, d'une part, de former les étudiants aux pratiques expérimentales in-vivo visant à étudier la régulation de ces fonctions végétatives. D'autre part, au delà de ces aspects disciplinaires, ces TP visent à l'acquisition de gestes techniques usuels d'expérimentation sur un modèle de laboratoire fréquemment utilisé en recherche : le rat. Enfin, les objectifs pédagogiques comprennent une sensibilisation de l'étudiant au bien-être de l'animal au cours de sa manipulation et à la prise en charge de la douleur.

Au cours de ces Travaux Pratiques, on utilise 1 rat par binôme soit au maximum 10 rats pour la procédure « étude de la régulation de la Pression Artérielle » et au maximum 10 rats pour la procédure « étude de la sécrétion pancréatique » par an. Afin d'améliorer l'encadrement de nos étudiants, ces TP sont organisés en 3 séances, chaque séance concernera au plus 6 ou 7 rats. Les procédures sont réalisées 3 fois par an.

Les animaux sont commandés la veille de la manipulation, la durée d'hébergement est donc limitée à son strict minimum.

La demande d'autorisation est faite pour une durée de 5 ans car elle permettra de couvrir la durée de l'habilitation de la formation qui a été obtenue en 2012.

961- Le diabète de type 1 qui représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique, concerne plus de 20 millions de personnes dans le monde. Cette maladie provient de la destruction auto-immune des cellules bêta insulino-sécrétrices des îlots endocrines du pancréas. Malgré l'instauration d'une insulinothérapie, le plus souvent très efficace pour traiter l'hyperglycémie chronique caractéristique de cette maladie, des complications multiples et graves peuvent se développer à court terme (hypoglycémie, acidocétose, coma) ou long terme (atteintes rénales, cardiovasculaires, oculaires ...). Dans certaines indications, la greffe de pancréas ou d'îlots/cellules pancréatiques est une alternative ou un complément thérapeutique nécessaire à l'insulinothérapie. Cependant, la pénurie d'organes ne permet pas d'envisager la greffe d'îlots pancréatiques humains comme solution réaliste en clinique (nécessité de 2 à 3 greffons/patient). Les résultats précliniques récents et prometteurs en matière de xénotransplantation d'îlots porcins encapsulés sans immunosuppression ouvrent la voie et rendent l'utilisation de cette approche thérapeutique réaliste dans le diabète de type 1.

L'objectif général de ce projet de 4 ans est de tester les dernières améliorations technologiques qui permettront de mener la xénothérapie cellulaire à la clinique dans le diabète de type 1. Notre projet vise le développement d'une méthode de xénothérapie cellulaire (pancréas bio-artificiel) utilisant les îlots de pancréas de porcelets encapsulés, positionnés sous-cutanée et transposables ensuite chez l'homme. Les objectifs spécifiques de ce projet sont (i) la comparaison de races « sauvages » de porcs « donneurs », et la comparaison avec une lignée de porcs double-k.o. pour deux xénoantigènes majeurs, (ii) la comparaison de biomatériaux d'encapsulation en utilisant des îlots pancréatiques murins (puis porcins) pour limiter le nombre de porcelets utilisés et (iii) l'intérêt de l'utilisation au sein du patch d'adjuvants moléculaires ou cellulaires qui diffusent localement au site de la greffe et dans un temps limité.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce protocole est de 276 souris et de 87 porcelets. Il correspond au total de l'ensemble des protocoles expérimentaux. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, les nombres d'animaux indiqués ici sont les minimums garantissant a priori une exploitation statistique des résultats. Les protocoles décrits dans cette demande sont répétés deux fois en moyenne afin de confirmer la reproductibilité du résultat obtenu et de garantir l'analyse statistique. Néanmoins, lorsque les différences observées sont importantes et claires dès 2 expériences, l'expérience ne sera pas répétée une troisième fois afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. L'analyse statistique correspond à des tests nonparamétriques sur de petits effectifs (<12).

962- Nos recherches portent sur l'imagerie et la régulation des processus cellulaires qui contrôlent la mise en place des membres au cours du développement embryonnaire.

Notre modèle animal est l'embryon d'oiseau. Pour pouvoir observer les cellules et suivre leurs mouvements, nous allons générer des cailles transgéniques dont les cellules exprimeront des protéines fluorescentes. Ceci nous permettra de visualiser par vidéo-microscopie, en temps réel au cours du développement de l'embryon de caille, les comportements cellulaires qui contrôlent la formation des membres. Le but de ce projet de recherche est de comprendre comment les cellules à l'origine du membre émergent au cours du développement, comment les membres initient leur formation et comment les cellules se différencient ensuite en trois éléments squelettiques (e.g. le bras, l'avant-bras et la main). Les lignées de cailles seront établies par une technique publiée et maintes fois utilisée qui utilise des vecteurs lentiviraux. Cette thématique ne peut pas être abordée in vitro puisque le but de ce projet est de comprendre comment les comportements cellulaires sont contrôlés au cours du développement embryonnaire, in vivo.

L'embryon d'oiseau se développe de manière externe, dans l'œuf ce qui est un avantage majeur pour visualiser le développement en temps réel de l'embryon. Ceci est impossible chez d'autres espèces animales, en particulier de mammifères. Le choix de cette espèce (i.e. la caille) est justifié par la petite taille des adultes, leur temps de génération rapide (2 mois), leur bonne production quotidienne d'œufs et leur facilité d'élevage en captivité. L'activité prévue concerne l'élevage de 4 lignées transgéniques et d'une lignée mutante. Le nombre minimal d'animal envisagé est de 16 femelles et 4 males par lignée et par an (renouvellement des reproducteurs tous les ans). Ceci nous permettra de collecter, environ 10 œufs exploitables par jour, ce qui est le minimum d'œufs nécessaire pour mener à bien les expériences proposées dans ce projet de recherche.

Le nombre d'animaux est donc estimé à 600 animaux au total pendant 5 ans. Les travaux de recherche utiliseront les œufs produits naturellement, sans aucune manipulation des adultes. L'environnement des animaux sera enrichi de manière à assurer leur bien-être. Les lignées génétiquement modifiées qui seront produites ne devraient pas développer de dommage pour les animaux. Ces animaux feront toutefois l'objet d'un suivi régulier pour détecter tout dommage imprévu et intervenir autant que de besoin.

963- L'obésité apparaît comme un facteur de risque de nombreuses pathologies chroniques dont le cancer du sein, particulièrement en post-ménopause. Chez les sujets obèses, un état sub-inflammatoire associé à l'insulinorésistance favorise la formation de médiateurs pro-inflammatoires et de radicaux libres qui sont des facteurs de risque de la carcinogenèse ainsi que de l'émergence des récidives ou des métastases.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur le micro-environnement tumoral dans le cadre de la cancérogenèse mammaire. La complexité du micro-environnement tant du point de vue des interactions cellulaires que moléculaires ne pouvant être abordée in vitro, la mise en oeuvre d'un modèle expérimental de tumeur mammaire syngénique chez la souris sauvage C57/BL6J (lignée EO771, issue de la même espèce de souris) devient nécessaire. Le projet sera conduit en 6 étapes successives afin d'étudier l'impact de l'obésité sur la croissance tumorale, puis sur la récurrence et l'apparition de métastases et enfin sur l'efficacité thérapeutique (radiothérapie, anticorps anti-EGF-R (Epithelial growth Factor Receptor : facteur de croissance épithéliale), modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes (SERM), inhibiteurs de l'aromatase (IA)). Pour chaque étape, 40 femelles C57/BL6J de 28 semaines (4x10), dont 20 ovariectomisées afin de mimer les conditions de la ménopause, recevront pendant 8 semaines soit un régime standard soit un régime high fat-high sucre (HF-HS, régime riche en graisse et en sucre). Les animaux seront placés en environnement enrichi favorisant les interactions physiques et sociales.

Les cellules tumorales EO771 seront implantées par la technique de « fat-pad » pour l'étude de la carcinogenèse ou par injection dans la veine caudale pour l'étude de la récurrence. Les animaux recevront ou non un traitement anticancéreux en parallèle de l'implantation des cellules tumorales, soit par radiothérapie pour l'étude de la carcinogenèse, soit par hormonothérapie à base de tamoxifène (SERM) ou de létrozole (IA), ou par immunothérapie à base d'anticorps anti-HER2 (Human epithelial receptor 2 : facteur de croissance épithéliale) pour l'étude de la récurrence. Les animaux seront sacrifiés sous anesthésie générale après 2 à 3 semaines de croissance tumorale. Le schéma de l'étude a été construit afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et d'optimiser les groupes pour répondre à l'objectif. Ainsi les animaux seront répartis en groupes de 10 individus, permettant un échantillonnage statistique suffisant. La réalisation du projet nécessite l'emploi de 240 animaux pour couvrir toutes les étapes.

Les durées des régimes, des traitements et de l'implantation des cellules tumorales sont issus de modèles publiés et de l'expérience des manipulateurs afin de garantir des temps d'expérimentation optimum pour le confort de l'animal.

Les manipulations les plus génératrices de stress et de douleurs pour les animaux sont l'ovariectomie et la croissance tumorale, celle-ci étant limitée à 3 semaines pour ne pas dépasser un poids supérieur à 1% du poids corporel total comme vu dans de précédents modèles.

Les avantages attendus de cette expérimentation sont la prise en compte du micro-environnement tumoral dans sa complexité avec les multiples acteurs cellulaires et moléculaires. Ce travail original doit contribuer à une meilleure compréhension des interactions entre l'obésité, l'exercice physique, la régulation du statut oxydant cellulaire et l'induction des signaux pro-inflammatoires responsables de l'inflammation chronique à bas bruit et de la cancérogenèse mammaire associée ou non aux traitements.

964- Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux. etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réaction d'hypersensibilité immédiate (ex : une anaphylaxie, c'est-à-dire une réaction allergique généralisée de l'organisme, sévère et rapide, constituant une urgence vitale pour le patient).

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex: directive 2007/47/CE, 21 CFR 820 ...) de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro: tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener: il s'agit dans ce projet de cobayes. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex: Pharmacopées nationales ...). Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est estimé à 150 par an.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les cobayes sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et plusieurs vétérinaires sont intégrés aux équipes à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

965- Le présent projet a pour but d'évaluer le potentiel ostéolytique de 2 lignées de carcinome mammaire (MDA-MB-435s SK3+ et MDA-MB-435s SK3') injectées dans le fût diaphysaire de fémurs de rats. Ces cellules d'origine humaine sont connues pour leur fort tropisme osseux et leur capacité à activer les cellules osseuses responsables de la dégradation osseuse (les ostéoclastes). De précédentes études ont montré que l'expression par les cellules tumorales du canal SK3 favorise la migration/invasion des cellules MDA-MB-435s à fort pouvoir métastatique. D'autre part, SK3 est un canal de la famille des canaux potassiques activés par le calcium. Or l'environnement osseux est riche en calcium et pourrait favoriser la prolifération des cellules tumorales exprimant le canal SK3 qui, en retour, activeraient la dégradation osseuse. Cette interaction entre les cellules et l'environnement complexe du tissu osseux ne peut être mimée autrement que dans un modèle animal dans lequel tous les paramètres sont retrouvés. S'il s'avérait que le canal SK3 est impliqué dans le processus de développement des métastases osseuses, un composé inhibant l'activité de ce canal pourrait avoir un intérêt comme traitement des métastases osseuses.

Afin de vérifier l'hypothèse détaillée ci-dessus, les cellules tumorales exprimant ou non le canal SK3 seront injectées dans le fût diaphysaire de fémurs de 42 rats Nude Crl:NIH-Foxn1rmu femelles. Les animaux seront répartis dans 4 groupes différents. Le 1er groupe sera composé de 6 animaux non opérés (contrôles sains), le 2eme groupe sera composé de 6 animaux dans lesquels seule une solution saline sera injectée (sham opérés), le 3eme groupe sera composé de 15 animaux dans lesquels seront injectées les cellules MDA-MB-435s SK3+ et le 4eme groupe sera composé de 15 animaux dans lesquels seront injectées les cellules MDA-MB-435s SK3'. Les dégradations osseuses induites par les cellules tumorales seront évaluées par analyses radiographiques 14 jours, 28 jours et 49 jours après l'injection des cellules. L'intégralité des animaux sera euthanasiée à la fin du protocole (J49). Toutefois, l'injection de substances dans le fût diaphysaire induit de fortes douleurs. Ainsi, un suivi clinique quotidien sera réalisé et un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Le nombre total d'animaux est justifié par les pertes possibles suite aux anesthésies répétées et le nombre minimal de 5 animaux dans les groupes 1 et 2 ; et 12 animaux dans les groupes 3 et 4 ; afin de pouvoir réaliser des tests statistiques pertinents.

966- La douleur a été étudiée sur une variété importante de modèles animaux et la quasi-totalité des antalgiques disponibles actuellement sur le marché ont été testés dans des modèles précliniques chez le rongeur. Ces modèles tendent à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant maladies ou blessures traumatiques, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Si les animaux sont incapables d'auto-évaluation, leurs comportements en réponse à des stimuli nociceptifs peuvent être étudiés de façon fiable et objectivement quantifiés (dimension sensori-discriminative de la douleur). Parallèlement, certains comportements spécifiques peuvent également suggérer la présence de douleur spontanée. La douleur a

enfin une composante émotionnelle et cognitive, limitant la capacité des patients souffrant de douleurs chroniques à réagir convenablement aux tâches de la vie quotidienne (anxiété, dépression, qualité de vie altérée). Ces composantes sont difficilement appréhendables chez l'animal mais un intérêt croissant existe pour ces nouvelles approches comportementales visant à évaluer des déficiences émotionnelles et cognitives associées à des douleurs chroniques. L'activité de la société s'inscrit dans ce cadre, visant à évaluer les propriétés antalgiques de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. L'offre s'appuie sur une sélection de modèles rongeurs mimant diverses pathologies douloureuses couvrant différentes aires thérapeutiques (neuropathies, pathologies articulaires, gastroentérologie, cancer, douleur post-opératoire, ...) et une diversité de tests comportementaux permettant d'appréhender les multiples composantes de la douleur. Les études d'efficacité antalgique sont exclusivement réalisées chez le rongeur (rats et souris), offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Les activités de la société s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Pour la société, les progrès méthodologiques et technologiques couplés aux avancées de la connaissance scientifique permettent d'une part de raffiner les modèles animaux existants et d'autre part de développer et proposer des modèles in vivo toujours plus proches des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être. Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes.

Dans le cadre de ce projet regroupant les activités de service et de R&D de la société, une estimation présentée en détail pour chaque procédure montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (5ans) est de 13160, soit 2600 rongeurs par an environ. L'objectif des études réalisées par la société est de fournir à ses Clients des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement de diverses pathologies douloureuses chez le patient.

967- Notre centre de recherche et d'investigation est une structure qui offre de nombreux services d'expérimentations couvrant un large domaine d'expertise. Une partie de ses compétences est réservée à l'évaluation pré-clinique de l'efficacité et de la toxicité de drogues candidates au statut de médicament humain ou vétérinaire. La présente saisine correspond à une demande d'étude de toxicité chez le chien par administration intraveineuse répétée d'une substance X ayant potentiellement des propriétés antinéoplasiques bénéfiques. Cette étude constitue un des volets du dossier pré-clinique qui inclut également des études de pharmacologie qui doivent être effectuées, avant tout essai chez l'homme, chez au moins deux espèces de mammifères dont le chien (JORF n°117 du 20 mai 2004 page 8960 texte n° 49).

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la dose maximale tolérée de la molécule X en administration intraveineuse répétée. Un nombre très limité de chien sera utilisé (4) dans cette étude ce qui est complètement cohérent avec le principe de réduction de la règle des 3R.