



**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 (2)

101- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité légale non corrigée chez les personnes âgées dans les pays industrialisés.

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu décryptés. Il existe deux formes de DMLA: la forme exsudative ou "humide" qui se développe rapidement et qui correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde et la forme atrophique ou "sèche" caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable d'une perte de la vision irréversible. Ces deux formes se développent sur un fond inflammatoire et sont associées aux mêmes polymorphismes.

L'IL-1 β participe à l'initiation des réponses inflammatoires aiguës et est notamment produite par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien lors de la DMLA. Son expression est également induite dans différents modèles animaux de DMLA.

L'antagoniste du récepteur de l'IL-1 β actuellement utilisé en clinique pour traiter des maladies inflammatoires telles que l'arthrite juvénile, IL-1 Ra, diminue significativement la néovascularisation. Dans la pratique courante, les molécules anti-VEGF sont habituellement utilisées pour traiter la forme exsudative de la DMLA. Cependant, ces molécules ne ciblent que la néovascularisation sans traiter l'inflammation à l'origine de la maladie et ont de nombreux effets secondaires rendant difficile leur administration à long terme. Par conséquent, l'inhibition de l'IL-1 β représente une alternative prometteuse à l'utilisation des anti-VEGF pour contrôler la néovascularisation choroïdienne associée à la DMLA.

Nous nous proposons de tester une molécule anti-IL-1 β , le Gevokizumab (un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'IL-1 β) dans un modèle de DMLA exsudative. La photocoagulation laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour induire une néovascularisation choroïdienne telle qu'on l'observe dans la DMLA exsudative. Ce projet d'une durée de 7 mois et utilisant 165 souris nous permettra:

- D'évaluer l'efficacité du gevokizumab à inhiber la néovascularisation choroïdienne
- De comparer l'efficacité d'une administration locale (intra-vitréenne) ou systémique (intra-péritonéale) du composé
- D'évaluer un potentiel effet additif de son association avec une thérapie anti-VEGF

102- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une affection grave, caractérisée par une élévation des résistances artérielles pulmonaires, faisant obstacle à l'éjection du ventricule droit et compromettant le débit cardiaque. Plusieurs anomalies fonctionnelles et structurales de la paroi des vaisseaux pulmonaires participent au développement de l'HTAP incluant : une hyperprolifération des cellules qui entourent les vaisseaux et une diminution du nombre de vaisseaux périphériques. Des situations cliniques très diverses peuvent conduire au développement d'une HTAP : sujets résidant en altitude, maladies respiratoires hypoxémiantes ou des maladies qui entraînent secondairement de l'HTAP tels que des maladies cardiaques, maladies congénitales Outre la transplantation pulmonaire dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement disponible pour les formes graves d'HTAP. Définir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'HTAP représente donc un objectif prioritaire, ne pouvant être envisagé qu'au travers de plusieurs étapes impliquant: i) l'identification des molécules responsables de la modification de structure des vaisseaux pulmonaires. ii) la mise au point et l'évaluation d'outils thérapeutiques destinés à corriger le ou les mécanismes identifiés; iii) la validation clinique des concepts obtenus au cours d'études expérimentales.

Ce projet porte sur l'implication de l'inflammation dans le développement de la maladie, en s'intéressant plus spécifiquement à certaines cytokines ainsi que leurs récepteurs. D'autre part des souris déficientes pour les récepteurs aux cytokines ont été générées par des équipes scientifiques. L'utilisation de la souris apparaît être un bon modèle pour générer de l'HTAP car semblable à celle présente chez les patients atteints d'HTAP. Chez la souris l'HTAP sera induite par une exposition des souris dans un caisson à 10% d'oxygène pendant 18 jours. Pour nos études nous comparerons des animaux sauvages à des animaux traités par un agent pharmacologique ou bien à des animaux déficients pour le récepteur à la cytokine étudiée. Pour chacun des groupes d'animaux nous utiliserons des lots d'animaux de 6 souris en raison de la variabilité des résultats dans un même groupe d'animaux. Afin de valider les résultats nous réaliserons chaque procédure 2 fois. Si les résultats sont divergents dans ces cas là nous serons amenés à réaliser une troisième fois cette procédure. Cela nous amènera à utiliser entre 780 et 960 souris. Les résultats obtenus seront ensuite recueillis et analysés par des tests statistiques adéquats.

Lors de l'exposition à l'hypoxie, un stress est généré aux souris se traduisant par une baisse d'activité et une perte d'appétit les premiers jours puis retrouvant une activité normale. Cela se traduit notamment par une perte de poids d'environ 5-10%. Si les animaux sont trop amaigris (perte > 15%), nous procéderons à l'euthanasie de l'animal concerné. Si nous observons des animaux qui se battent entre eux, nous isolons le mâle dominant dans une cage séparée afin d'éviter des blessures.

103- Analyse des effets comportementaux (mémoire et anxiété) d'un nouveau composé contre la toxicité amyloïde mise en œuvre dans un modèle non-transgénique de la maladie d'Alzheimer. Prestation de Service pour l'industrie.

Le composé (codé pour raison de confidentialité) sera injecté à différentes doses par voie orale chez des souris développant une maladie type Alzheimer.

L'anxiété et les déficits de mémoire, et leur éventuelle réversion par le composé, seront analysés par des tests classiques de neuropharmacologie, test du labyrinthe en croix et apprentissage en piscine. Cette étude comprend 9 groupes expérimentaux recevant des traitements pharmacologiques différents avec n = 12 animaux par groupes, soit au total 108 souris analysées. Le nombre de groupe a été décidé par le client pour avoir une étude pertinente (nombre limité de doses et contrôles nécessaire à la rigueur scientifique). Le nombre d'animaux par groupe est le nombre minimum permettant une analyse statistique cohérente dans les analyses utilisées. Cette étude est non invasive pour l'animal et permet un criblage rapide de l'activité du composé sur des paramètres pathomimétiques (ici, altération cognitive) réduisant considérablement le nombre total d'animaux nécessaires au développement du programme.

104- Comparaison de l'activité neuroprotectrice d'un nouveau composé sous forme racémique et énantiomérique contre la toxicité amyloïde mise en œuvre dans un modèle non-transgénique de la maladie d'Alzheimer.

C'est une prestation de service pour une compagnie pharmaceutique visant à caractériser l'efficacité ou l'inefficacité du composé. Le composé (codé pour raison de confidentialité) sera injecté à différentes doses par voie orale chez des souris développant une maladie type Alzheimer. Les déficits de mémoire, et leur éventuelle réversion par le composé, seront analysés par des tests classiques de neuropharmacologie, l'alternance spontanée et l'évitement passif. Cette étude comprend 6 groupes expérimentaux recevant des traitements pharmacologiques différents avec n = 12 animaux par groupes, soit au total 72 souris analysées. Le nombre de groupe a été décidé par le client pour avoir une étude pertinente (nombre limité de doses et contrôles nécessaire à la rigueur scientifique). Le nombre d'animaux par groupe est le nombre minimum permettant une analyse statistique cohérente dans les analyses utilisées. Cette étude est non invasive pour l'animal et permet un criblage rapide de l'activité du composé sur des paramètres pathomimétiques (ici, altération cognitive) réduisant considérablement le nombre total d'animaux nécessaires au développement du programme.

105- La rentabilité économique et la survie des élevages de petits ruminants dépendent en partie du contrôle des infections parasitaires au pâturage. Ce contrôle ne peut plus faire appel exclusivement à la chimiothérapie compte tenu du développement de la résistance aux vermifuges chez les parasites et de la présence de résidus dans les produits d'origine animale et l'environnement. Notre projet consiste à définir des marqueurs d'infestation non invasifs permettant de ne traiter que les animaux les plus infestés. Deux axes d'étude sont envisagés. Le premier axe consiste à étudier les variations de température corporelle des moutons infestés. En effet, les hôtes les plus sensibles aux parasites montrent des variations très importantes de température corporelle lors d'infestation parasitaire. L'utilisation de transpondeurs, mesurant en continu la température corporelle des animaux, pourrait ainsi permettre de repérer ces hôtes les plus sensibles. Le second axe d'étude comprend l'utilisation de marqueurs moléculaires pour sélectionner les ovins résistants à ces parasites dans les programmes d'amélioration génétique. L'identification et la caractérisation de tels marqueurs génétiques nécessitent l'évaluation de la résistance d'un grand nombre de moutons afin de rechercher les mutations génétiques responsables.

Pour répondre à ces questions et parce qu'aucun modèle alternatif n'existe à l'heure actuelle, l'expérimentation sera réalisée par une infestation expérimentale de moutons vivants. Etant donné la fréquence des variants alléliques les plus rares (1%), 417 moutons de deux races différentes présentant des sensibilités opposées (race Martinik et Romane) seront infestés expérimentalement afin de déterminer leurs caractères de résistance. Les variants alléliques dont ils sont porteurs sera également déterminé. Cet effectif permettra d'estimer au mieux l'effet des variants alléliques les plus rares. Dans un but de réduction des animaux utilisés et d'optimisation de leur utilisation, la température corporelle interne sera étudiée dans 20 de ces mêmes moutons.

Suite à ces mesures, l'intégralité des animaux sera vermifugé et pourront être utilisés dans un système d'élevage classique permettant la valorisation de leur viande.

Ainsi, cette infestation expérimentale bénéficie d'un ratio bénéfice/coûts très favorable puisqu'elle: correspond au niveau d'infestation rencontré par les ovins au pâturage en situation d'élevage, apporte les réponses aux questions posées en considérant un nombre suffisant d'animaux ne nuit pas à la valorisation des moutons dans un circuit classique d'élevage.

106- Les dispositifs médicaux constituent un élément clé à la fois dans le domaine diagnostique et dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, ils incarnent des produits ingénieux dont la recherche et le développement s'avèrent désormais indispensables pour satisfaire l'ensemble des besoins de santé. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables comme des allergies, des irritations, voire des réactions généralisées de l'organisme.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir intégralement. En effet, si des méthodes alternatives existent,

elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur complexité chimique.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener: il s'agit dans ce projet de rongeurs (cobayes, souris, hamsters) et de lapins. Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes de référence. L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 34 000 cobayes, 29 900 souris, 4 350 lapins et 250 hamsters.

Par ailleurs, lorsque les interventions seront susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures seront envisagées. De plus, tous les animaux jouiront d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des procédures. Enfin, les animaux grégaires seront hébergés en groupes dès que l'essai le permet; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères seront maintenus dans tous les cas; des chaînettes pourront être suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes pourront être disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent; enfin, de la musique sera diffusée dans les salles d'hébergement pour apaiser les animaux.

107- La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps, affinités, liposomes, etc. ...) et de plusieurs radioéléments (Astate 211, Iode 131, Lutetium 177, yttrium 90, Scandium 47, cuivre 67, etc. ...), certains connus qui servent de références et des nouveaux, produits en particulier par le cyclotron Arronax.

La mise en œuvre de nos protocoles nécessite donc un calendrier contraint de production de radioéléments et de préparation du radiopharmaceutique afin de réaliser nos expérimentations.

Nos études suivent le même protocole. Le système vecteur-ligand-radioélément est d'abord testé sur des cellules tumorales en culture. Quand l'efficacité est démontrée, les cellules tumorales sont greffées à des souris.

Le système vecteur- ligand-radioélément est injecté aux animaux porteurs de tumeurs pour étudier la distribution dans un organisme vivant, la fixation du radioélément sur la tumeur et tous les organes.

Nous réalisons des images de ces souris par différentes méthodes (bioluminescence, PET-Scan, IRM) avant et après les radioimmunothérapies vectorisées qui nous permettent de mesurer l'efficacité du traitement et sa toxicité sur les tissus sains.

Cette demande d'autorisation concerne 215 souris nude, 60 C57BL6KaIRij, 30 C57BL/6 CEA transgéniques et 30 SCID beiges.

Le développement de l'imagerie peut permettre une réduction du nombre d'animaux car il n'est pas nécessaire de sacrifier les souris à chaque fois.

108- La mélatonine est une hormone produite par la glande pinéale la nuit et dont la durée de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit. Chez les mammifères, c'est par l'intermédiaire de ces variations de durée de sécrétion que le cerveau intègre l'information photopériodique pour synchroniser les fonctions physiologiques (reproduction, hibernation) avec les saisons. L'hypothèse de travail appuyée sur des travaux préliminaires obtenus dans l'équipe et d'autres publiés est que l'information photopériodique qui est connue pour entraîner les fonctions saisonnières à une période de 1 an (ou moins avec des photopériodes accélérées expérimentales) peut aussi être intégrée par des mécanismes nerveux et/ou endocrines qui n'impliquent pas la mélatonine. Dans ce travail, nous voulons vérifier cette hypothèse en étudiant si il y a une variation du rythme d'expression de la protéine C-FOS (expression de C-FOS traduit une activation cellulaire) dans les neurones des noyaux marqués en fonction des variations de la durée du jour ou de la nuit (photopériode) chez des animaux dépourvus de mélatonine par ablation de la glande pinéale.

Des hamsters d'Europe (120 au total) seront donc pinéalectomisés et ensuite placés dans un environnement photopériodique accéléré (changement annuel de la photopériode sur une période de 6 mois donc deux cycles annuels obtenus sur les mêmes animaux en 1 an ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés pour ce type d'expérience). Un groupe d'animaux sera utilisé après 3 mois d'exposition en photopériode courte (conditions de l'hiver) et un autre groupe en fin de période d'augmentation de la longueur des jours (période d'été). Les rythmes d'expression de la protéine C-FOS seront ensuite déterminés dans les noyaux marqués par immunocytochimie. La synchronisation des animaux aux conditions photopériodiques sera vérifiée indirectement par le suivi journalier du rythme circadien de température corporelle via un capteur-enregistreur implanté dans la cavité péritonéale de chaque animal. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec analgésie post-opératoire. Les hamsters d'Europe mâles doivent être isolés au sevrage sans quoi ils se battent. Ceci correspond à leur mode de vie à l'état naturel. Ils seront maintenus dans des cages enrichies (barreaux à ronger, matériel de nidation ou tunnel) et en contact olfactif et visuel (cages en polycarbonate, ouvertes) avec leurs congénères. Le hamster d'Europe est utilisé car c'est un des rares rongeurs à présenter une horloge circannuelle. Le résultat de cette étude nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de synchronisation annuelle du cycle de reproduction à l'environnement, connaissances indispensables à toute politique de réintroduction du hamster d'Europe dans l'environnement

109- Au cours des dernières années nous avons fait des progrès remarquables dans la compréhension des mécanismes régulant le sommeil, et en particulier concernant le rôle de la lumière sur le sommeil et la vigilance. Ces découvertes nous permettent de suggérer un nouveau modèle de régulation du sommeil. Un troisième processus de régulation par la lumière complète le modèle classique « à deux processus » : circadien (C; correspondant au cycle veille/sommeil de 24 heures déterminé par l'horloge interne située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus -N8C) et homéostatique (S; équilibre dynamique de la pression de

sommeil augmentant au fur et à mesure de l'éveil et diminuant pendant le sommeil). Le troisième mécanisme correspond à l'influence directe non-circadienne de la lumière. Nous proposons que la lumière (via des cellules ganglionnaires de la rétine exprimant un photopigment: la mélanopsine) puisse moduler directement le processus homéostatique. Notre but est de caractériser d'avantage les effets non circadiens de la lumière, en particulier sur l'homéostasie sommeil.

Il est bien connu que la lumière exerce un effet sur l'humeur. Nos travaux cherchent à mieux appréhender les mécanismes sous-jacents, notamment via une action directe non circadienne sur l'homéostat du sommeil et via des projections des cellules rétinienne à mélanopsine vers les structures impliquées dans le contrôle de l'humeur.

Finalement, nous souhaitons étudier comment les mécanismes de régulation du sommeil peuvent à leur tour influencer le système mélanopsinergique au niveau de la rétine (cellule à mélanopsine et transduction du signal lumineux).

Pour cela nous utilisons des modèles de rongeurs nocturnes (souris transgéniques) et diurnes (*Arvicanthis Ansoorgei*), nous permettant d'extrapoler les résultats à l'homme. Le projet portera sur un total de 1110 animaux.

Afin d'optimiser le nombre d'animaux chaque lot peut subir différents paradigmes lumineux consécutifs en respectant un temps minimal entre chaque paradigme afin d'obtenir une récupération complète des cycles naturels. De plus les animaux peuvent provenir d'expériences préalables n'induisant pas d'effet sur la question posée ce qui permet la réduction de la production d'animaux pour ce projet.

L'utilisation de l'animal entier est obligatoire aux vues de la question posée impliquant des systèmes biologiques diverses et complexes allant de la rétine avec l'intégration du signal lumineux, au comportement de l'animal en passant par des systèmes neuronaux complexes.

Dans le cadre du raffinement des conditions d'ébergement, les animaux sont maintenus jusqu'à l'expérience en groupe, étant des animaux sociables, et un enrichissement est réalisé par l'ajout de nids. D'autre enrichissement tels que tubes, maisons ou balancettes ne peuvent être utilisés car empêcheraient l'exposition des animaux à la lumière et donc fausseraient les résultats du projet.

110- Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent principalement la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces maladies résultent d'une inflammation chronique d'une partie du tube digestif dont les causes, probablement multifactorielles, ne sont pas clairement connues.

La maladie de Crohn peut atteindre tous les segments du tube digestif, mais les atteintes sont généralement iléo-caecales et segmentaires. Son évolution se fait le plus souvent par poussées séparées de périodes de rémission plus ou moins longues. Les symptômes les plus fréquents sont l'apparition de diarrhées avec présence de sang ou de glaires, des douleurs abdominales et une perte de poids accompagnée d'une détérioration de l'état général. La rectocolite hémorragique est également une pathologie inflammatoire chronique.

Elle se distingue de la maladie de Crohn par la localisation exclusive des lésions au niveau du côlon. Les symptômes associent des selles fréquentes, des émissions de glaires sanglantes, des faux besoins et des douleurs abdominales.

En France, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique touchent chacune environ 1 personne sur 1000, soit plus de 100 000 cas en tout.

D'un point de vue thérapeutique, on distingue les traitements des poussées, visant à mettre le plus rapidement possible le tube digestif « au repos » des traitements d'entretien visant à maintenir le plus longtemps possible cette rémission. Différents types de traitements sont classiquement utilisés (salicylés, corticoïdes, immunosuppresseurs, antibiotiques, anticorps anti-TNF α) mais ils n'apportent pas à ce jour une réponse totalement satisfaisante, leur utilisation peut être accompagnées d'effets secondaires importants et ils ne sont pas efficaces chez tous les patients.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, il apparaît clairement que les efforts engagés pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant à la fois de mieux contrôler les poussées et d'en diminuer le nombre, doivent être poursuivis. Ces développements passent par la réalisation de tests effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés. Le modèle d'inflammation colique induit par l'administration de dextran sulfate sodium (DSS) compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés et fait l'objet du présent projet.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 50 par série expérimentale pour un total de 15 séries sur 5 ans, soit 750 souris. Le point limite a quant à lui été fixé sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS1985 modifiée.

111- Le vomissement est considéré comme un réflexe de protection, activé en réponse à l'ingestion d'une toxine. Il apparaît également dans une grande variété de situations (mal des transports, gestation) pour lesquelles son bénéfice n'est pas toujours expliqué. C'est un acte stéréotypé complexe nécessitant la coordination de nombreux muscles somatiques et viscéraux. L'expulsion du contenu gastro-intestinal, facilitée par un profond bouleversement de la motilité digestive, résulte pour l'essentiel de la contraction momentanément synergique des muscles respiratoires.

Le déclenchement du réflexe émétique repose sur l'activité d'un groupe de neurones situés au niveau du tronc cérébral. Bien que confortable sur le plan didactique, le concept d'un « centre du vomissement » anatomiquement circonscrit est définitivement abandonné. En effet, les régions bulbaires pouvant contenir les neurones impliqués dans l'intégration des messages afférents et la genèse de l'activité motrice émétique correspondent à l'area postrema, au noyau du tractus solitaire, au noyau dorsal moteur du nerf vague et à la formation réticulée bulbaire.

Ce réseau de neurones peut être activé par un grand nombre de signaux afférents (nerveux ou humoraux) provenant du tube digestif, du cœur, de la cavité oropharyngée, du système vestibulaire, de l'area postrema ou des structures nerveuses

supérieures. Au-delà des causes évoquées précédemment, l'apparition de nausées et de vomissements peut également apparaître en réponse à la prise de médicaments. La nausée figure ainsi parmi les effets secondaires qui peuvent être associés à la prise de plus de 50% des médicaments actuellement sur le marché. C'est plus d'un tiers des médicaments qui sont concernés si l'on associe nausées et vomissements. Enfin, de récentes prévisions indiquent que près de 30% des médicaments actuellement en cours de développement conduiront chez l'homme à l'apparition de nausées et de vomissements aux posologies efficaces. Dans le cas de la prise de médicaments, la survenue de nausées et vomissements peut avoir des conséquences importantes. Elle est avant tout un obstacle majeur à son absorption et donc à son efficacité, notamment dans le cas de prises orales. L'apparition de nausées et vomissements peut également impacter de manière considérable la qualité de vie des patients, pouvant même conduire à l'interruption du traitement. Par ailleurs, la perte d'eau et d'électrolytes associés à des crises émétiques prolongées peut engendrer des déficits collatéraux importants.

Compte tenu des éléments évoqués plus haut, et dans la mesure où ces effets secondaires ne sont pas limités à quelques rares pathologies ou à un nombre restreint de classes pharmacologiques, l'étude des propriétés émétiques de nouveaux candidats médicaments doit être envisagée aussi tôt que possible dans le processus de développement du médicament. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés. En effet, la complexité du réflexe émétique, tant d'un point de vue de la diversité des voies d'activation que des médiateurs et des récepteurs mis en jeu, nécessite une évaluation sur animal entier.

Alors que les rongeurs classiquement utilisés au laboratoire ne sont pas capables de vomir, le furet reste le modèle de choix pour l'étude du vomissement et sera l'espèce utilisée dans le cadre de ce projet. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 49 par série expérimentale pour un total de 25 séries sur 5 ans, soit 1225 animaux, dont la très grande majorité sera réutilisée plusieurs fois. Le point limite a quant à lui été fixé sur la base de l'apparition de signes caractéristiques, concomitants à l'installation d'une sensation douloureuse.

112- Objectifs: mesurer l'efficacité parasitologique de 2 protocoles de traitement aux stronglycides (2 anthelminthiques) sur la charge parasitaire (bilans nécropiques) après infestation expérimentale de veaux sevrés.

Calendrier: août-septembre 2013, à confirmer par les résultats préliminaires sur le terrain (réduction d'excrétion fécale post-traitement), durée de l'essai = 2 mois, 15 à 18 veaux

Matériels et méthodes (simplifié):

1. les animaux: 18 veaux sevrés (2-3 mois)
2. les infestations parasitaires: chaque animal sera inoculé en une fois, oralement, par 6.000 larves infestantes (L3) de strongles
3. trois groupes d'animaux seront définis:
 - a. groupe témoin (n=5-6) non traité
 - b. 2 groupes traités (n=5-6 x 2) par des anthelminthiques réalisés 25j après l'inoculation

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

4. après abattage des animaux (euthanasie au T61®), un bilan parasitaire sera réalisé par comptage des parasites adultes dans la caillette et l'intestin grêle selon les procédures en vigueur (Cales et al, 1992).

Résultats:

La comparaison des charges parasitaires dans les différents lots traités avec le lot témoin de référence fournira les données d'efficacité parasitologique pour les différentes molécules testées. Ces données seront confrontées à celles de la littérature disponible pour les autres pays européens ou non européens. La confirmation d'une résistance aux anthelminthiques chez les bovins en France constituerait une information originale et d'une grande importance.

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

Le protocole de confirmation par infestation expérimentale, traitement puis abattage ("controlled efficacy test" des anglo-saxons) est le seul valide pour conclure à une résistance des nématodes. Elle implique, par là même, l'emploi de l'espèce hôte (bovin) comme animal expérimental. Le protocole d'infestation est standardisé et assure une infestation qualifiée de sub-clinique c'est-à-dire sans conséquence visible sur l'état de santé. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (5-6 animaux par lot, 3 lots).

113- La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie chronique fréquente dans le monde occidental et est généralement associée au syndrome métabolique (insulinorésistance, diabète de type 2, obésité). Cette pathologie est aussi rencontrée en association avec des infections virales (hépatite C chronique) ou après l'exposition à certains médicaments (chimiothérapie). La NASH se caractérise par une stéatose du tissu hépatique (accumulation de lipides dans le foie) accompagnée d'une nécroinflammation, avec ou sans fibrose.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la NASH et potentiellement de la fibrose.

De nombreux modèles utilisant des rats ou souris ont été décrits dans la littérature pour l'étude de ces pathologies. Aucun de ces modèles ne reproduit parfaitement la physiopathologie humaine de la NASH. Aussi, l'évaluation thérapeutique de nos molécules sera réalisée dans plusieurs espèces/modèles, afin de palier aux limites de chacun.

Dans le cadre ce projet, des souris dont un gène d'intérêt a été invalidé seront aussi étudiées. Ces souris ont un métabolisme des lipides et du glucose dérégulé. Les expériences utilisant cette souche particulière permettront de caractériser l'importance de ce gène d'intérêt dans la mise en place et la sévérité de la NASH et ainsi représenter une cible de choix pour le développement de nouvelles options thérapeutiques pour cette pathologie.

L'évaluation thérapeutique des composés pharmaceutiques dans le traitement des hépatopathies chroniques, telles que la NAFLD (stéatose hépatique non alcoolique), la NASH (stéatohépatite non alcoolique) et leur évolution possible vers la fibrose, sera réalisée au cours de la durée couverte par ce projet avec 7094 souris et 620 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». Les NASH et NAFLD sont des pathologies qui nécessitent un traitement chronique de longue durée, ce type de protocole est difficile à réaliser autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée.

114- Les maladies mitochondriales touchent environ 25 personnes sur 100000 et sont considérées comme les plus fréquentes des maladies métaboliques. Ces pathologies résultent d'une altération par mutation de l'ADN des mitochondries, petites structures intracellulaires qui produisent l'énergie nécessaire à la cellule. Ces maladies se traduisent donc par un déficit énergétique des tissus. S'agissant d'un système ubiquitaire, tous les tissus peuvent être touchés. Ce sont cependant ceux dont les besoins énergétiques sont importants (muscles, cœur, systèmes nerveux et endocrinien, reins) qui sont le plus souvent affectés. Elles se traduisent donc par des myopathies, myocardiopathies, troubles de la vision et de l'audition. Ces maladies présentent une grande hétérogénéité clinique, peuvent se manifester à tout âge, et peuvent toucher un ou plusieurs organes. Certaines mettent en jeu le pronostic vital.

Leur diagnostic est complexe et doit être précoce. L'identification des mutations génétiques responsables de ces pathologies est donc importante. Le projet vise à développer de nouvelles solutions diagnostiques et thérapeutiques de ces maladies mitochondriales

Outre ces pathologies, de plus en plus d'études montrent qu'un dysfonctionnement mitochondrial pourrait être impliqué dans des maladies telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et le cancer.

Il est donc primordial de mieux comprendre la physiologie de la mitochondrie, les impacts de ses dysfonctionnements sur l'organisme, leur contribution dans les maladies afin de proposer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques.

Cette compréhension passe par l'utilisation de modèles animaux de ces pathologies. Il existe des modèles transgéniques (animaux atteints d'une mutation génétique) et quelques modèles pharmacologiques (dysfonctionnement induit par administration de composés chimiques). L'utilisation des modèles pharmacologiques est la première étape du projet avant le recours aux modèles génétiques. Ces modèles permettront d'évaluer chez l'animal (rat et souris) les conséquences du dysfonctionnement mitochondrial sur différentes fonctions telles que la vision, l'audition, la locomotion ainsi que d'effectuer des essais thérapeutiques pour corriger ces troubles. Une histopathologie des tissus atteints permettra d'étudier les troubles au niveau cellulaire.

Les études réalisées au sein du Centre de Recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Un support en biostatistiques est apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 480 rats et 480 souris par an.

115- Le but de ce projet est de permettre à une équipe de mettre en place la technique chirurgicale dite de « Plug-Unplug » en utilisant le modèle primate non humain. La mise au point de cette méthode chez le primate permettra de proposer cette technique chirurgicale en France (uniquement proposée par une seule équipe chirurgicale en Europe pour le moment).

Cette technique permet la prise en charge anténatale de la hernie, diaphragmatique chez les fœtus ayant un pronostic vital défavorable du fait d'une hypoplasie pulmonaire sévère. Elle consiste en la pose d'un micro-ballonnet dans la trachée du fœtus (plug) afin de forcer le développement des poumons par l'accumulation des productions pulmonaires puis au retrait (unplug), de ce micro-ballonnet avant la naissance.

Ce projet a déjà fait l'objet d'un agrément auprès d'un comité d'éthique en 2009. Les premières chirurgies ont permis aux chirurgiens de s'approprier le modèle puis de réaliser le geste d'intubation du fœtus avec succès lors de plusieurs interventions. Lors d'une de ces interventions, un ballonnet a été déposé puis retiré avec succès. Le but du renouvellement de cet agrément est de pouvoir poursuivre l'entraînement des chirurgiens à la pose et au retrait du ballonnet jusqu'à une maîtrise complète du geste. La suite du projet nécessite encore la réalisation d'une vingtaine d'interventions pour permettre aux chirurgiens de maîtriser complètement le geste de pose et retrait du ballonnet et ainsi finir de mettre en place cette technique. Le geste est réalisé sur des macaques (*Macaca mulatta* ou *fascicularis*) gestantes dans le 3ème tiers de la gestation. Le modèle "primate non humain" est le seul modèle pertinent de part la similarité à la fois (i) de l'anatomie et la physiologie de la gestation et (ii) de l'appareil

respiratoire entre les deux espèces. Aucune séquelle par rapport à une gestation classique n'a été observée ni sur la mère ni sur le petit.

116- Les réglementations internationales imposent qu'une évaluation de la toxicité des produits soit faite chez l'animal avant leur première administration chez l'homme et/ou leur mise sur le marché.

Les études de Toxicologie Générale, conduites le plus souvent dans deux espèces (rongeur et non rongeur), ont pour objectif d'identifier les effets adverses observés suite à l'administration de ces produits afin de pouvoir définir les dose(s) à administrer chez l'homme.

Actuellement aucune méthode alternative n'est validée pour remplacer les études réglementaires effectuées sur l'animal de laboratoire en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché.

Le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont définis par les lignes directrices internationales ICH (International Conference on Harmonisation) et sur des bases scientifiques afin d'avoir un effectif minimum mais statistiquement exploitable pour pouvoir interpréter les éventuels effets adverses.

De plus, le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée.

Nombre d'animaux: 1000

Espèce animale: souris

117- Ce projet s'inscrit dans un programme de prestation de services proposé par l'établissement utilisateur GENFIT à son client dont le but d'apporter des solutions technologiques pertinentes à destination des investigateurs du monde de la santé. En développant des applications et services innovants d'analyse dans le domaine de la santé pour accélérer le développement de médicaments, le développement de moyens de diagnostic/pronostic rapides pour différentes pathologies (cancers, auto-immunité, cardiologie, maladies du système nerveux central, maladies métaboliques, métabolisme phosphocalcique, maladies ophtalmiques), une équipe d'experts a permis en associant des technologies d'imagerie et de mesures physico-chimiques (spectrométrie de masse) de réduire le nombre d'animaux, et de se dispenser de l'utilisation de traceurs/marqueurs radioactifs lors des études de pharmacocinétique chez l'animal. Ces études visent à étudier le devenir dans les organismes vivants des futurs médicaments.

L'évolution technologique et la mise à disposition de cette nouvelle technologie présente cet avantage indéniable de proposer une méthodologie plus fine et reproductible qui permet de Réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés en respect de la règle des 3R qui dicte l'expérimentation animale. La technique aujourd'hui appliquée à des petits rongeurs (rats et souris dans notre cas) nécessitera l'emploi de 500 rats et 500 souris pour la durée de 5 années que couvre ce projet.

De même l'archivage des échantillons biologiques en l'occurrence ici les lames de coupes d'histologie de tissus fixés autorise la multiplicité des essais et mesures sur un même organe ou tissus issu d'un seul animal, participant ainsi au principe de Raffinement.

L'objectif et l'aboutissement de ces études sont de soulager et aider les personnes atteintes de maladies en apportant des solutions thérapeutiques, de dépistage, de diagnostic par le biais de technologies modernes.

118- Nous réalisons des Travaux pratiques auprès d'étudiants inscrits à la faculté de Pharmacie.

L'objectif de ces enseignements est d'initier les étudiants à la pratique de l'expérimentation animale dans le contexte de découverte de molécules thérapeutiques.

Les travaux pratiques s'adossent aux cours de Pharmacologie générale et permettent aux étudiants de réaliser des expériences simples de pharmacologie comportementale.

Les expériences sont menées majoritairement sur des souris et exceptionnellement sur des rats (observation uniquement). Les molécules testées sont des molécules de référence utilisées aux doses usuelles, les tests de comportement mis en œuvre sont très bien décrits dans la littérature, ce qui nous permet de les reproduire en utilisant un nombre réduit d'animaux (groupe de 1 à 2 animaux).

Durant le cursus des études de Pharmacie, ces travaux pratiques sont pour les étudiants une occasion unique de travailler sur des modèles in vivo; ils ont donc une place importante dans la formation.

119- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité irréversible des personnes de plus de 65 ans dans les pays industrialisés. La DMLA, dans sa forme dite « sèche » se manifeste par une dégénérescence des photorécepteurs et de l'épithélium pigmenté de la zone maculaire. Les mécanismes conduisant à la dégénérescence des photorécepteurs sont encore mal connus. Les travaux réalisés ces dernières années, en particulier par notre laboratoire, indiquent que des cellules du système immunitaire (les monocytes et les macrophages) qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien pourraient avoir un rôle initiateur dans le déclenchement de cette pathologie.

Notre laboratoire a montré que la déficience en CX3CR1 (un récepteur de chimiokine), chez la souris (*Mus musculus*) mène à une accumulation de cellules macrophagiques dans l'espace sous-rétinien et à une dégénérescence des photorécepteurs. Cet effet s'accroît avec l'âge des souris, mimant ainsi la pathologie humaine. Cette neurotoxicité plus importante des macrophages CX3CR1^{-/-} dans ce modèle reste encore inexpliquée, ainsi que les différentes voies de signalisations qui mènent à cette neurotoxicité. Comprendre ces mécanismes ouvrira de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de la DMLA.

Le but de ce projet est d'étudier les différentes voies de signalisations des macrophages sous-rétiniens qui mènent à cette neurotoxicité vis-à-vis des photorécepteurs. Nos résultats préliminaires in vitro montrent que cette neurotoxicité passe par la

voie IL-1 β via le récepteur à l'ATP, P2X7. Le rôle de la déficience en CX3CR1, P2RX7, IL-1 β sera donc étudié *in vivo* afin de déterminer l'implication de ces molécules sur la neurotoxicité des macrophages de l'espace sous rétinien.

Les phases préliminaires de ce projet ont été menées sur des modèles *ex vivo* pour limiter les manipulations sur l'animal vivant et ont permis d'établir un modèle de neurotoxicité des macrophages sous-rétiens relevant de la pathologie humaine. Ces résultats doivent être maintenant validés *in-vivo* sur le petit animal et dans différents modèles d'inflammation sous-rétinienne pour valider nos expérimentations et être en mesure de proposer des cibles thérapeutiques.

Pour mener à bien ce projet, 922 souris (*Mus musculus*) de différents fonds génétiques seront utilisées. Le projet est établi sur la base d'expériences prévues en triplicat, et composées de groupe de 6 animaux pour pouvoir mettre en évidence des effets significatifs par cette approche expérimentale complexe.

Pour éviter toute souffrance animale, les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale de courte durée (inhalation d'isoflurane ou injection intra-péritonéale de xylazine 10 mg/kg et kétamine 50 mg/kg) et seront examinés quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié de l'animalerie.

120- La maladie d'Alzheimer (MA) est caractérisée par la formation continue dans le cerveau de lésions pathologiques qui entraînent progressivement la mort des neurones, une atrophie corticale et le déclin des fonctions cognitives, dont en premier lieu des troubles de la mémoire. En raison du vieillissement accru de la population, la MA majoritairement liée à l'âge est un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Actuellement, les traitements autorisés sont symptomatiques mais d'une efficacité modeste, et la recherche préclinique sur les animaux modèles contribue au développement d'autres thérapeutiques contre la MA.

L'objectif général de ma recherche s'inscrit dans le cadre de nouvelles stratégies préventives ou curatives de la MA en utilisant des analogues de synthèse de neurostéroïdes naturels pour protéger le cerveau des effets toxiques induits par les peptides β -amyloïde. Nous évaluerons leurs effets protecteurs sur la perte mémoire en liaison l'expression de protéines impliquées dans la mort neuronale. L'utilisation des animaux est indispensable car elle permet de reproduire la majeure partie des troubles cliniques (en particulier déficits de mémoire) comparables à ceux de la MA dans un temps relativement court et d'évaluer les effets de traitements. Soixante rats âgés de 2 mois à leur arrivée et hébergés par groupe cinq par cage seront acclimatés aux conditions de température et d'humidité pendant une semaine, puis manipulés pour se familiariser à l'expérimentateur. Ils seront implantés sous anesthésie avec une canule guide à demeure dans le cerveau, dans des conditions aseptiques avec l'utilisation d'antalgiques et d'anti-inflammatoires. Les rats seront répartis en 5 lots expérimentaux de 12 rats/groupe. Ces nombres ont été choisis sur la base d'expériences précédentes du même type publiées dans la littérature qui ont permis d'obtenir des effets significatifs. Les animaux seront administrés dans le cerveau une seule fois par un ou deux composés, et leurs performances évaluées dans un test de mémoire spatiale basé sur la tendance naturelle du rongeur à explorer un environnement nouveau. Pendant la période post-opératoire et toute la durée des expériences, les points limites tels qu'une perte de poids rapide ou chronique de plus de 20% maximum par rapport au poids initial; un pelage hérissé, une absence de toilette, de prise de nourriture ou de boisson; un comportement stéréotypé, une agitation anormale, une diminution marquée de l'activité ou une immobilité ne sont pas observés dans 96% des cas. Ces travaux pourraient être à l'origine du développement de stéroïdes particuliers pour ralentir la dégénérescence des neurones et améliorer les symptômes mnésiques dans la MA débutante. Ces stéroïdes de synthèse sont potentiellement non métabolisables en hormones stéroïdes susceptibles de produire des effets secondaires, ce qui représente un intérêt majeur en clinique. Enfin, leur potentiel thérapeutique pourrait éventuellement être applicable dans le cadre de lésions neuronales ou d'autres maladies neurodégénératives.

121- L'œuf de poule est un ovocyte entouré de réserves nutritionnelles et d'une enveloppe protectrice (la coquille), C'est dans cette enceinte close naturelle, autosuffisante et stérile, que l'embryon va se développer sans contacts maternels. La poule doit donc anticiper l'ensemble des besoins nécessaires à l'embryon et déposer dans l'œuf la totalité des ressources utiles à son développement (nutriments, systèmes de protection, molécules régulatrices, ...). La coquille assure la protection physique de l'œuf et protège l'embryon au cours de son développement dans le milieu extérieur. Cette coquille est impénétrable à toutes bactéries lorsqu'elle reste intacte et assure le maintien de la stérilité de l'œuf.

Notre étude vise à comprendre les mécanismes de formation de la coquille de l'œuf de poule, afin d'identifier des voies d'améliorations des défenses naturelles de l'œuf et renforcer la sécurité alimentaire des œufs de consommation. Les animaux utilisés seront des poules de souches commerciales. Sur chaque animal sera effectué un prélèvement sanguin et le prélèvement du fluide utérin lors de la ponte de l'œuf. Les animaux sont élevés pendant 1 an environ correspondant à la période de production d'œufs. Ils seront donc renouvelés tous les ans pour une durée d'expérimentation totale de 5 années. Le nombre d'animaux maximum sera de 96 par an, soit un total maximum de 480 pour les 5 ans d'expérimentation. Un nombre limité sera sacrifié pour permettre le recueil de tissu biologique afin d'étudier l'expression des acteurs moléculaires impliqués dans la formation de l'œuf.

Ce type d'expérimentation ne peut être réalisé qu'*in vivo*. Seuls le nombre d'animaux permettant de dépasser les seuils statistiques et fiables seront utilisés. Les personnes en charge des procédures expérimentales veilleront au respect des animaux en toutes circonstances.

122- Chez la chienne ou chez la truie, les traitements d'induction de l'ovulation sont largement utilisés sur le terrain afin de traiter les pubertés retardées ou l'absence de retour en chaleur après le sevrage (pendant la période estivale ou chez des truies ayant beaucoup maigri pendant la lactation ou des primipares). Le traitement appliqué, injection d'hormones gonadotropes

exogènes est efficace, mais la réponse ovarienne est hétérogène, ce qui a des conséquences néfastes sur la fertilité ou la survie embryonnaire.

Le commanditaire souhaite donc développer, pour les mêmes indications, une approche de stimulation alternative ou, au lieu d'injecter des hormones exogènes, on stimulerait la sécrétion d'hormones endogènes.

Pour ce faire, nous proposons d'utiliser un peptide stimulant la sécrétion de GnRH (et donc des 2 hormones gonadotropes endogènes, LH et FSH ; hormones qui stimulent l'ovulation). La preuve que l'administration, par infusion pendant 24 heures, de ce peptide est capable d'activer l'axe hypothalamus-ovaires a été très largement apportée par les travaux menés chez la brebis montrant une induction de l'ovulation succédant à une élévation de ces concentrations de LH suite à l'administration de ce peptide.

Via une technologie brevetée, le commanditaire a produit un peptide longue action dont une seule injection permet, également chez la brebis en anœstrus d'induire une stimulation des gonadotropines endogènes suivie d'une ovulation fertile.

L'objectif de l'étude est de vérifier chez la cochette que le même peptide longue action présente des caractéristiques pharmacocinétiques (1/2 vie et biodisponibilité par voie intra musculaire i. m.) et pharmacodynamiques (aptitude à augmenter les gonadotropines endogènes) compatibles avec une efficacité dans ce modèle (différent de la brebis par une phase folliculaire plus longue). 10 cochettes de 70 kg seront utilisées pour cette étude, 5 recevront une injection intra musculaire, 5 recevront une injection intra veineuse afin de valider la voie d'injection.

L'évolution des profils pharmacocinétiques sera contrôlée par des prises de sang.

L'induction de l'ovulation ovarienne sera évaluée. La démonstration de l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire par un tel traitement nécessite en effet une approche intégrée chez l'animal et ne peut être faite in vitro. Afin de limiter le recours aux animaux, les 2 groupes (IV et IM) seront regroupés pour documenter la 1/2 vie du peptide longue action et ses effets sur la LH. La mesure de la 1/2 vie du composé testé ne peut se faire qu'in vivo.

123- Une thérapie ciblée est un traitement innovant qui agit sur des altérations biologiques présentes dans des sous-groupes de cancers. Nous avons obtenu au laboratoire huit modèles porteurs ou non de différentes altérations moléculaires cibles de ces thérapies.

Les altérations qui nous intéressent ici, se divisent en trois grandes classes principales que sont les altérations des voies EGFR, PI3K et AKT. Pour ces différentes voies, les thérapies seront testées sur les modèles porteurs des mutations ciblées et sur des modèles non mutés en parallèle servant de contrôles à ces expériences.

Concernant la voie EGFR, de nombreuses molécules existent et l'association de ces thérapies pourrait permettre d'éviter la mise en place de mécanismes de résistance. Prenant conseil auprès de cliniciens spécialisés dans ce domaine, nous avons choisi de tester les trois molécules les plus prometteuses seules ou en association. Il s'agit de l'afatinib, de l'erlotinib et du cetuximab, et de faire des associations avec deux autres molécules d'intérêt: un inhibiteur de la voie PI3K (le BKM120) car l'un des modèles testés que l'on sait résistant à certains inhibiteurs de la voie EGFR, est porteur d'une mutation activatrice PI3K et un agent déméthylant (l'azacytidine) qui pourrait permettre de potentialiser l'effet inhibiteur des autres thérapies.

Pour ce qui est des modèles présentant une mutation KRas, l'activité d'une molécule inhibitrice de la voie MEK, choisie selon les mêmes critères cliniques, le PD0325901, sera également évaluée et cette molécule sera associée à un inhibiteur de la voie PI3K (le BKM120), voie publiée comme intervenant dans la résistance aux inhibiteurs de MEK. Ces molécules seront à leur tour associées à l'agent déméthylant qu'est l'azacytidine pour observer une éventuelle potentialisation de leurs effets inhibiteurs.

Des prélèvements seront effectués au sacrifice. Cinq tumeurs par groupe seront en partie congelées à sec et fixées en formol avec recueil des sera. Ces prélèvements permettront de confirmer et/ou identifier les marqueurs responsables de la résistance des tumeurs.

En cas de réponses complètes, les traitements seront poursuivis jusqu'à échappement et des modèles de variants résistants seront ainsi développés et permettront des études ultérieures sur la résistance.

Une expérience de tolérance des molécules associées sera effectuée avant ces expériences d'efficacité afin de déterminer les doses auxquelles ces molécules seront administrées.

124- Des données récentes suggèrent que les bisphosphonates (BPs), puissants agents anti-résorption osseuse, peuvent représenter une alternative thérapeutique prometteuse dans le traitement des tumeurs osseuses primitives telles que l'ostéosarcome ou le sarcome d'Ewing. En effet, en ciblant le microenvironnement osseux ces agents peuvent limiter de façon indirecte le développement tumoral. Ces résultats ont constitué le rationnel des essais cliniques O82006 et EWING2008 dans lesquels les patients pédiatriques et adultes atteints respectivement d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing peuvent être traités avec le zometa® (acide zolédronique, bisphosphonate de troisième génération) en traitement adjuvant à la chimiothérapie. Or comme ces tumeurs osseuses touchent préférentiellement les enfants, les adolescents et les jeunes adultes, un traitement par un inhibiteur de la dégradation osseuse pourrait altérer l'évolution normale du développement et de la croissance osseuse. C'est pourquoi une première série d'expériences avait été réalisée sur des souriceaux d'âge équivalent à celui des patients pédiatriques traités dans les protocoles actuels. Les souriceaux traités par l'acide zolédronique autour de l'âge pubertaire, entre J19 et J39 ont montré un arrêt transitoire de la croissance osseuse pendant le traitement, et réversible dès l'arrêt du traitement. Afin de compléter ces études, il nous paraît important de développer des protocoles appliquant des traitements encore plus précoces (entre J1 et J19) afin d'étudier un éventuel effet sur l'éruption et l'élongation dentaire, ainsi que sur la fermeture des sutures crâniennes. En effet, des patients âgés de 5 ans sont susceptibles d'être inclus dans les protocoles actuels et donc de recevoir très tôt un traitement par l'acide zolédronique. De plus, des études antérieures utilisant des BPs (de 1ère et 2ème

génération) moins efficaces que l'acide zolédronique et utilisés à plus faibles doses avaient montré un retard d'éruption dentaire chez des rats.

C'est pourquoi nous proposons d'étudier chez le souriceau nouveau-né l'effet précoce de l'acide zolédronique à la fois sur la fermeture des sutures crâniennes mais aussi sur l'éruption et l'élongation dentaire. Cette étude sera réalisée en application de la règle des 3R (remplacer, raffiner, réduire); ces expérimentations ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations sur des cultures de cellules, l'aspect développement nécessite de travailler sur le corps entier. D'autre part, les expérimentations seront conduites dans un souci de prise en charge du bien-être animal, avec l'enrichissement des conditions de vie des souris, et la prise en charge de la douleur (expérimentations avec procédure légère). Enfin, le nombre d'animaux inclus dans l'étude est réduit au minimum (135 au total), mais nécessite néanmoins des groupes de 5 à 10 souriceaux pour valider des résultats statistiquement significatifs.

125- L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente et est la seconde cause de mortalité par cancer chez l'enfant et l'adolescent. Il dérive de la cellule souche mésenchymateuse (CSM) engagée dans la différenciation ostéoblastique. Il existe des arguments en faveur de l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) dans l'OS qui pourraient être issues de CSM. En effet, des sous populations de cellules, exprimant des marqueurs de pluripotence des CSM avec en plus la capacité à pousser en oncosphères, peuvent être isolées à partir de lignées d'OS ou de biopsies. Cependant une seule étude a démontré le potentiel tumoral in vivo d'une de ces populations isolées à partir d'une biopsie d'OS humain, tandis qu'une autre étude identifie ces sous-populations comme des CSM non-tumorales. Par ailleurs, les CSM normales co-injectées avec des lignées d'OS de rat ou de souris augmentent la croissance tumorale.

Dans notre étude, nous avons isolé des populations cellulaires in vitro à partir d'OS de haut grade, présentant des caractéristiques de CSM : morphologiques, phénotypiques, potentiel de différenciation, avec des caryotypes normaux. Elles présentaient aussi des critères anormaux pour des CSM : croissance prolongée en culture standard sans beta Fibroblast Growth Factor (bFGF), génération de sphères en culture en milieu semi solide.

Afin de tester la tumorigénicité de cellules humaines, un modèle de xénogreffe sous cutané a été réalisé dans le laboratoire (MSC de rat marquées à la luciférase) ; il a été observé une diffusion cellulaire dans les tissus, empêchant la formation d'une pseudotumeur initiale. Le coussinet de la souris est une zone cloisonnée permettant le maintien in situ de la greffe pendant une durée plus longue. Par ailleurs, le modèle orthotopique intra tibial n'est pas réalisable devant une impossibilité de surveillance clinique de l'apparition d'une tumeur.

Le but de cette première étude est de savoir si ces cellules possèdent des capacités tumorigènes directes chez la souris SCID en comparaison avec des CSM normales issues de moelle osseuse. C'est une étape indispensable afin de savoir s'il s'agit ou non de CSC.

En cas d'absence de tumorigénicité directe, nous voudrions déterminer si cette population cellulaire particulière possède des capacités de soutien de la croissance tumorale lors d'une co-injection avec une lignée d'OS humain (MNNG-HOS) chez la souris Nude en comparaison avec une co-injection de CSM normales issues de la moelle osseuse ainsi qu'avec une injection de MNNG HOS seule.

Ces expérimentations seront réalisées en application de la règle des 3R (remplacer, raffiner, réduire); ces expérimentations ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations sur des cultures de cellules, l'étude du concept de tumorigénicité directe nécessite de travailler sur le corps entier. D'autre part, les expérimentations seront conduites dans un souci de prise en charge du bien-être animal, avec l'enrichissement des conditions de vie des souris, une surveillance quotidienne des animaux et la prise en charge de la douleur (expérimentations avec procédure légère). Enfin, le nombre d'animaux inclus dans l'étude est réduit au minimum, mais nécessite néanmoins des groupes de 3 (SCID) ou 6 (nudes) souris pour valider des résultats statistiquement significatifs, soit 450 souris au total sur 5 ans.

126- Les tumeurs osseuses primitives malignes ont une faible incidence (300 nouveaux cas 1 par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 18 ans pour les ostéosarcomes et à 65 ans pour les chondrosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes chez l'adulte). Malgré des avancées dans la prise en charge des ostéosarcomes par des cures de polychimiothérapies moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce groupe de patients qui demeure à haut risque.

Les cellules tumorales osseuses résultent d'une différenciation des cellules souches mésenchymateuses dans deux voies principales, la voie ostéoblastique pour les ostéosarcomes et la voie chondrocytaire pour les chondrosarcomes. Cependant, ces cellules ne sont que partiellement engagées dans ces voies, et cet état indifférencié a pour conséquence une dérégulation importante de leur prolifération, ce qui se traduit par une agressivité et une chimiorésistance accrues des tumeurs chez le patient.

Une nouvelle stratégie thérapeutique consisterait à modifier in situ les cellules tumorales afin d'induire leur différenciation dans l'une des voies mésenchymateuses.

Ces cellules plus différenciées pourraient voir leur taux de prolifération considérablement ralenti et exprimeraient des marqueurs cibles identifiés, ce qui faciliterait grandement le ciblage thérapeutique.

L'objectif de la présente étude est d'induire la différenciation ostéoblastique en surexprimant le micro-ARN miR152 dans la lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome

HOS. Ces cellules modifiées seront ensuite injectées chez des souris immunodéficientes

de type NMRI-nu (nu/nu) afin de déterminer l'effet d'une surexpression du miR152 sur le développement tumoral.

L'expérimentation animale est ici indispensable, puisqu'il est impossible d'obtenir des données sur la tumorigenèse de ces cellules en culture cellulaire. Afin d'obtenir des données statistiquement analysables, nous avons choisi d'utiliser un total de 28 souris, avec un groupe contrôle de 4 souris et 3 groupes expérimentaux de 8 souris injectées avec 3 différents types de cellules HOS modifiées. Le fait de répéter les injections de cellules témoins et modifiées permet en effet d'étudier la reproductibilité des effets observés: le nombre d'animaux a ainsi été réduit au minimum mais dans des mesures satisfaisantes pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative.

L'injection de cellules d'ostéosarcome en site para-osseux est une procédure légère, et toutes les dispositions nécessaires seront prises en cas de souffrance des animaux.

127- Le remplacement articulaire prothétique permet actuellement de traiter de façon fiable les patients atteints de lésions dégénératives avancées des articulations du membre supérieur et inférieur. Plus de 1,3 million de prothèses sont ainsi implantées chaque année dans le monde. L'âge des patients candidats raisonnables à une prothèse de hanche est aujourd'hui inférieur à 65 ans dans 50% des cas.

Cependant, les études cliniques à long terme ont montré que la durée de vie de tels implants prothétiques était limitée. Les mécanismes à l'origine de ces échecs ne sont pas encore tous complètement élucidés, mais il semble acquis que la cause principale des échecs observés est le descellement aseptique, habituellement associé à une ostéolyse (dégradation de l'os) péri prothétique initiée par les particules d'usure issues du frottement de la partie articulaire de la prothèse. Cette dégradation est observée chez environ 20 % des patients à partir de 10 ans de recul.

Il est clairement admis aujourd'hui que le vieillissement a une influence tant sur le métabolisme osseux que sur le déroulement de différentes réactions inflammatoires. L'objet de ce projet est d'étudier sur un modèle expérimental de petit animal (souris) l'influence du vieillissement sur la réaction d'ostéolyse aux particules d'usure. Nous voulons étudier en effet des éventuelles différences dans l'enchaînement de cette réaction inflammatoire à corps étrangers (particules d'usure) chez des souris d'âges variés dont le crâne serait en contact avec les particules de polyéthylène issues de l'usure de prothèse. Une comparaison sera faite entre 3 groupes de 20 souris: jeunes (2mois), intermédiaires (12mois) et âgées (24mois). La nécessité d'utilisation du modèle murin avec exposition des particules de polyéthylène sur calvaria s'explique simplement. Les études en cultures cellulaires in vitro ne permettent pas de prédire de façon fiable et précise l'ostéolyse in vivo. Le tissu osseux regroupe plusieurs familles cellulaires ayant chacune son propre rôle dans le remodelage et l'homéostasie osseuse elle-même régulée par un système hormonal complexe. La souris C57/BL6 est par ailleurs la plus sensible aux particules. Enfin de nombreuses études sur l'ostéolyse chez ce modèle de souris ont donné des résultats très pertinents au regard de la pathologie clinique humaine.

Nous espérons pouvoir mettre évidence une différence en ce qui concerne la réactivité immunitaire dans l'ostéolyse aux particules, entre les individus d'âges différents, soit en terme de chronologie d'évolution, soit en terme d'intensité ou type de réaction. En pratique clinique, ces données doivent permettre de mieux définir un profil à risque individuel de développement et entretien de l'ostéolyse aux particules. Les chirurgiens doivent ainsi disposer de plus d'informations dans le choix des biomatériaux lors de la pose de prothèse, mais aussi dans le suivi de leurs patients déjà porteurs de cupule en polyéthylène.

128- Aujourd'hui, la transplantation d'organe constitue une arme thérapeutique à part entière à la disposition des médecins en cas de défaillance irréversible d'un organe (rein, foie, cœur, ...) Cependant, si des progrès considérables ont été réalisés tant en matière de techniques chirurgicales que dans le maniement des thérapeutiques immunosuppressives, l'un des problèmes majeurs rencontrés est celui de la réaction immunologique de rejet.

Pour éviter ces rejets, de traitements lourds sont nécessaires, et les effets secondaires engendrés parfois sévères.

Par ailleurs, on sait que l'absence congénitale de membre (agénésie) est plus fréquente que les amputations acquises (traumatiques et thérapeutiques). Les facteurs de risque sont non spécifiques (l'âge des parents, l'utilisation maternelle d'alcool, de tabac ou de cocaïne) et la prévalence (fréquence) est de 1 sur 20 000 naissances vivantes.

On ne peut raisonnablement pas, en l'état actuel des connaissances, envisager une transplantation de main chez un enfant agénésique compte tenu des conséquences du traitement immunosuppresseur.

Notre projet a pour but d'approfondir les connaissances sur les thérapies immunosuppressives chez le porcelet nouveau-né et sur l'induction de tolérance aux greffes (permettant l'arrêt des traitements), afin de pouvoir envisager des greffes de tissu composite (membres, face, ...). Pour cela un modèle complet, immunologique et chirurgical, est indispensable, ce qui implique le recours à l'animal.

La présente étude porte sur la tolérance et la pharmacocinétique, chez le porcelet, du mycophenolate mofetil (MMF), un immunosuppresseur couramment utilisé en médecine humaine lors des greffes. Pour cela, 3 doses différentes seront testées, ainsi qu'un placebo, sur 12 animaux au total. En effet, il faut au minimum 3 animaux par groupe pour obtenir des données exploitables à l'aide de tests statistiques.

Durant le projet présenté ici, les jeunes animaux seront conservés avec leur mère et retirés uniquement quelques instants pour la réalisation des prises de sang. Afin d'éviter tout stress ou douleur inutile, ces prises de sang seront réalisées sous anesthésie "flash", grâce à un gaz anesthésique, permettant un endormissement et un réveil instantané.

Il n'existe à ce jour aucune donnée sur l'emploi de cette molécule sur des animaux aussi jeunes, cette étude permettra donc:

- l'obtention d'informations fondamentales potentiellement transposables à l'Homme
- la poursuite du projet de recherche global sur les greffes de tissus-composite chez le Porc nouveau-né

Afin de détecter l'apparition d'effets secondaires non connus et de les prendre en charge de façon optimale, les animaux seront sous étroite surveillance clinique durant toute la procédure.

129- Le but principal du projet est de comprendre les mécanismes neuronaux qui contribuent à l'apprentissage et l'exécution de séquences motrices qui requièrent une précision spatiotemporelle ("motor skills"). Spécifiquement le rôle et codage des neurones du striatum un noyau sous-cortical dont la dysfonction génère des troubles moteurs (maladie de Parkinson, syndrome de Tourette ...) seront examinés. Dans une première partie, le projet combine des enregistrements électrophysiologiques à grande échelle sur le rat en comportement. La tâche de comportement est une tâche de Contrôle de la vitesse de locomotion sur tapis roulant. La combinaison d'un tapis roulant et de méthodes d'enregistrements électrophysiologiques à grande échelle a plusieurs avantages: 1) Un grand nombre de neurones est enregistré par animal (200-600 neurones). 2) Un grand nombre d'essais (chaque essai, ou course dure entre 5 et 20s)

Peut facilement être effectué. 3).Le comportement moteur est très bien quantifié avec une camera placée latérale. La qualité des données électrophysiologiques et comportementales nous permet 1) de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour générer des résultats statistiquement puissants et 2) d'examiner les mécanismes neuronaux qui contribuent au contrôle moteur, mécanismes qui ont classiquement été examinés chez le primate non-humain. Pour compléter les expériences corrélatives, ci-dessus, des expériences d'inactivation pharmacologique et de manipulations optogénétiques seront effectuées afin de confirmer que les activités neuronales du

Striatum contribuent directement au contrôle de la locomotion. Les électrodes et les canules guides (injections pharmacologiques et stimulations optiques) seront implantées de manière chronique sous anesthésie générale (isoflurane + bupivacaine locale) et contrôle stéréotaxique. Les chirurgies seront effectuées en conditions aseptiques (stérilisation instruments, aseptisation environnement proche, "no touch" + utilisation d'un stérilisateur de table à billes chaudes). Tout sera fait pour limiter les douleurs post-opératoires (1 injection de Buprenorphine, puis Doliprane pédiatrique) et les risques d'infection (1 injection Baytril).

Dans une deuxième partie, des expériences seront réalisées chez la souris afin d'utiliser deux lignées transgéniques qui expriment la CRE recombinase sélectivement dans les neurones striataux qui constituent la voie directe et la voie indirecte (la fonction de ces deux populations neuronales est débattue). Nous combinerons des enregistrements électrophysiologiques, tâche comportementale et manipulations optogénétiques sur la souris, dans une tâche de locomotion tête fixe, afin de comprendre la fonction respective de ces deux populations de neurones.

Le nombre total d'animal prévu dans ce projet est de 123 (63 rats et 60 souris). Le remplacement de ces animaux par des approches in vitro n'est pas possible puisqu'il s'agit ici de comprendre les mécanismes qui contrôlent l'exécution fine des séquences motrices complexes, mécanismes déficients dans plusieurs maladies cérébrales. Par contre le nombre d'animaux est significativement réduit par l'utilisation de grilles d'électrodes sur l'animal en comportement. En effet un grand nombre de neurones peut être enregistré par animal et des corrélations directes (donc statistiquement puissantes) peuvent être faites avec le comportement. Enfin tout est mis en œuvre pour réduire au minimum le stress (hébergement en groupe, habituation progressive aux protocoles comportementaux) et les douleurs postopératoires (anesthésie gazeuse, utilisation d'anti-inflammatoires et antalgiques).

130- L'anastomose est un geste de suture circulaire, pratiquée dans le cadre de centaines d'opérations chirurgicales et consistant à reconnecter entre eux deux organes creux.

Alors que les enjeux fondamentaux de la Santé sont d'apporter une meilleure qualité de vie aux patients tout en contrôlant les coûts, l'anastomose représente une problématique médico-économique majeure en raison de plusieurs facteurs:

Risques pour le patient si l'étanchéité de l'anastomose n'est pas parfaite (effets secondaires lourds).

Fatigue du chirurgien qui réalise ce geste long, difficile et délicat à la fin de l'opération.

Diminution de l'efficacité des hôpitaux et cliniques du fait d'une occupation du bloc opératoire non optimale, la durée du geste variant de 20 minutes à plusieurs heures, et d'une durée de séjour des patients suffisamment longue pour garantir la bonne cicatrisation de l'anastomose

Coûts pour les assurances santé liés à la durée de l'intervention, du séjour et aux effets secondaires

Actuellement, aucun dispositif médical ne combine les propriétés uniques de la suture au fil, offrant une cicatrisation naturelle des tissus et un fort pouvoir de serrage, avec la rapidité, la simplicité et la sécurité apportées par les dispositifs médicaux mécanisés.

L'élément d'essai développé ici est le premier dispositif de suture circulaire automatisée permettant de réaliser l'anastomose urétrovésicale en quelques minutes, avec des bénéfices pour l'ensemble des parties prenantes.

Cet élément d'essai a été conçu à partir de matériaux déjà présents sur le marché et ayant fait la preuve de leur biocompatibilité chez l'homme. Néanmoins, chaque procédé de fabrication est unique et les risques associés à ces procédés doivent être pris en compte. Ceci explique le recours au modèle animal porcin pour valider le fonctionnement du dispositif et l'absence de danger pour l'être humain des matériaux et éléments constitutifs de l'élément d'essai. Ce dispositif médical étant amené à être utilisé en clinique humaine pour réaliser des anastomoses, cette étude va être réalisée afin d'évaluer l'efficacité du dispositif à réaliser une anastomose circulaire dans des conditions semblables aux futures conditions d'utilisation. Dans les publications, le porc charcutier est le modèle préconisé pour les développements de techniques chirurgicales à visée humaine.

Cette étude a de multiples objectifs:

Évaluer le dispositif à réaliser une anastomose circulaire en situation chirurgicale

Valider la qualité de la cicatrisation obtenue et comparaison à une anastomose réalisée de manière conventionnelle (suture manuelle).

131- Il est depuis longtemps reconnu que l'environnement lors de la vie intra utérine et post-natale est capital pour la santé de l'individu. Or, la grossesse est un état physiologique caractérisé par une augmentation de production de radicaux libres. Bien que cette élévation reste en général modérée, une augmentation trop importante aboutissant à un stress oxydant durant la grossesse a des effets néfastes sur la santé du nouveau-né. Il est par exemple reconnu qu'un stress oxydant trop important chez la mère peut diminuer fortement la tolérance au glucose des petits. Il apparaît donc important de modérer ce stress oxydant durant la grossesse pour prévenir, chez l'enfant, l'apparition de pathologies comme le diabète de type 2. Pour cela, l'entraînement régulier et modéré en endurance, reconnu pour avoir des effets bénéfiques sur l'équilibre entre pro et antioxydants (statut redox) de l'individu et pour augmenter la sensibilité au glucose nous a semblé une piste à explorer. Etant donné qu'il existe une corrélation entre le niveau de stress oxydant de la mère et du fœtus, nous allons étudier si l'entraînement de la mère avant et pendant la période de gestation peut avoir des conséquences sur les petits.

Cette étude devrait nous permettre de mettre en lumière les liens métaboliques concernant le statut redox et la sensibilité au glucose et à l'insuline qui unissent la mère à ses petits pendant la gestation, et que ces liens métaboliques sont modulables par un entraînement en endurance. Le modèle utilisé sera un modèle murin de rat, 24 mères et 48 petits seront utilisés (plus 32 non soumis à une procédure expérimentale au sens réglementaire (contrainte inférieure au seuil réglementaire))

Ce protocole ne fait appel qu'à des procédures expérimentales légères (ou sans réveil, guillotine et prélèvement de tissu) n'entraînant pas de douleur chez l'animal ou une douleur légère et très brève. Cependant, comme nous suivons très précisément le poids des animaux ainsi que leur prise alimentaire (2 fois par semaine tout au long du protocole) s'il s'avérait que l'un d'entre eux perde du poids de façon importante (25 g pour les mères et 10g pour les petits au cours d'une semaine, soit 10% du poids corporel total) il serait euthanasié.

132- Il s'agit d'un protocole pour estimer l'utilisation digestive de l'énergie, des protéines, des 1 matières grasses, des acides aminés et des acides gras de 2 biomasses d'algues chez le porc en croissance. Le protocole prévoit 2 essais pour des mesures:

- au niveau fécal, pour évaluer la digestibilité dans l'ensemble du tube digestif;

- au niveau iléal, pour évaluer la digestibilité dans la première partie du tube digestif et jusqu'à la fin de l'intestin grêle.

Dans chaque essai, les biomasses seront incorporées à un régime de base et l'utilisation digestive des biomasses sera calculée par différence entre le régime supplémenté et le régime de base. Dans l'essai 1, 15 porcs (5 par régime) seront placés dans des cages pendant 18 jours pour une période d'adaptation aux conditions d'hébergement et d'alimentation (10 jours) et une période de mesure de l'ingestion et de collecte des fèces (8 jours). Dans l'essai 2, 8 porcs seront opérés pour la mise en place d'une anastomose iléo-rectale reliant la fin de l'intestin grêle au rectum et mis en cage pendant 3 semaines. Ensuite, chaque porc recevra successivement les 3 régimes expérimentaux, puis un régime à très faibles teneurs en protéines et en lipides au cours de 4 périodes successives d'une semaine (4 jours d'adaptation au régime puis 3 jours de mesure de l'ingestion et de collecte des excréta).

Les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des nutriments et de l'énergie chez les porcs. L'anastomose iléorectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digestas de la fin de l'intestin grêle. Le nombre d'animaux dans chaque essai et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour le calcul des valeurs nutritionnelles des 2 biomasses.

133- Le remplacement articulaire prothétique permet actuellement de traiter de façon fiable les patients atteints de lésions dégénératives des articulations du membre supérieur et inférieur (i.e. prothèse totale de hanche pour traiter l'arthrose). Plus de 1 million/an de prothèses sont ainsi implantées dans le monde, et avec le vieillissement de la population, ce nombre est en constante progression.

Cependant, les études cliniques à long terme (15 ans de recul) ont montré que la durée de vie de tels implants prothétiques était limitée par la survenue d'ostéolyse (dégradation de l'os) autour de la prothèse ce qui entraîne la perte de fixation et donc une ré-intervention chirurgicale.

Le frottement au niveau des composants de la prothèse articulaire, libère de débris d'usure, ceux-ci sont reconnus comme corps étrangers et activent une cascade immunitaire responsable de l'ostéolyse et donc de la faillite de l'implant.

Il existe différents types de matériaux utilisés dans les prothèses, le polyéthylène étant celui le plus utilisé. On distingue trois types de polyéthylènes différents par leur procédé de fabrication et par leurs propriétés physico-chimiques:

- le polyéthylène conventionnel de haut poids moléculaire (UHMWPE = ultra-highmolecular- weight-polyethylene),
- le polyéthylène hautement réticulé (HXLPE= highly crosslinked polyethylene) qui est bio-mécaniquement plus résistant mais qui contient des radicaux libres susceptibles de s'oxyder in vivo (délétère pour sa résistance à long terme).
- Depuis 2008, le polyéthylène dopé à la vitamine E (PE-Vit.E) a été développé car inoxydable.

A ce jour il n'existe aucune étude comparative entre ces 3 types de polyéthylène.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier sur un modèle expérimental de petit animal (souris) quel polyéthylène entraîne le moins d'ostéolyse.

Les souris utilisées sont de souche C57BL/6J âgées de 8 semaines, elles représentent le modèle animal pour les études d'ostéolyse aux particules d'usure.

Des particules stériles de polyéthylènes (obtenues par cryopulvérisation) seront déposées sur le périoste du crâne de ces souris (os facilement accessible, intervention la moins douloureuse). Ainsi le polyéthylène au contact du périoste de la souris déclenchera une réponse inflammatoire dont le profil sera différent selon le type de polyéthylène implanté (hypothèse principale de notre étude). Cette inflammation aura pour conséquence une activation des ostéoclastes et donc une ostéolyse.

Cette procédure est décrite et validée dans la littérature internationale, et bien maîtrisée par notre équipe de recherche. On constituera quatre groupes de souris: groupe 1 Sham (sans implantation de particules), groupe 2 (UHMWPE), groupe 3 (HXLPE) et groupe 4 (PE-Vit.E).

Nous réaliserons une étude comparative entre les souris témoins et les souris des différents groupes de polyéthylène par:

- Un suivi in vivo:
 - de l'inflammation par bioimagerie
 - et de l'ostéolyse par microscanner.
- Une analyse ex vivo:
 - de l'ostéolyse par microscanner puis histologie
 - et de l'inflammation par dosage de cytokines.

Nous espérons ainsi que nos résultats contribueront à prolonger la survie des prothèses articulaires, et donc à diminuer le nombre d'échecs à long terme de ces implants.

134- La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie liée au vieillissement caractérisée par l'incapacité de générer de nouveaux souvenirs. Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité des oligomères solubles du peptide β -amyloïde (A β 0s) est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives.

Pour ce projet, nous voudrions évaluer l'effet de différentes molécules viennent d'un screening bio-informatique. Nous caractériserons in vivo l'effet bénéfique éventuel de ces molécules sur les capacités mnésiques et les fonctions synaptiques chez la souris exposée à l'A β 0s, tout en étudiant les mécanismes par lesquels elles peuvent protéger les synapses et les neurones des dysfonctionnements induits par les A β 0s.

Le modèle animal utilisé représente un test de la sensibilité des souris au stress amyloïde induit par l'injection stéréotaxique intracérébroventriculaire (ICV) d'A β 0s. L'annulation des effets délétères de l'ICV des A β 0s sur les troubles mnésiques des souris et sur l'altération des profils synaptiques de l'hippocampe permettra de définir l'efficacité de ces molécules pour prévenir du stress amyloïde et donc la MA pour laquelle aucun traitement thérapeutique efficace n'est encore disponible.

Ce projet nécessite 648 souris. Ce nombre est suffisant et nécessaire pour obtenir de bonnes interprétations statistiques correctes des résultats. Nous surveillons tout au long de l'étude l'état général de l'animal notamment la présence d'une perte de poids excessive (+ de 10 % du poids initial). Pendant la période post-opératoire (ICV en stéréotaxie), l'apparition de signes de souffrance est particulièrement surveillée lors de la phase de réveil et toute la journée. Lors des 3 jours suivants les souris sont surveillées 2 fois par jour.

135- La maladie de Parkinson est une affection neurologique d'origine incertaine, provoquée par la destruction irréversible des neurones dopaminergiques. L'objectif de ce projet est d'étudier un groupe de molécules potentiellement neuroprotectrices dans un modèle in vivo qui reproduit plusieurs caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Parkinson Ce modèle animal, contrairement aux modèles cellulaires, prend en compte les interactions entre les neurones dopaminergiques et les autres cellules, notamment les cellules immunitaires. 272 souris seront nécessaires pour l'obtention de résultats significatifs et nous veillerons à réduire la douleur, la souffrance et le stress des animaux.

136- Les tumeurs cérébrales, et particulièrement les Glioblastomes multiforme (GBM, astrocytomes de grade N) étant de mauvais pronostic, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est indispensable. L'immunothérapie passive ou adoptive vise à administrer à un patient des effecteurs immunitaires, autologues ou non, reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales à éliminer. Notre projet vise à développer, à l'aide de modèles in vivo, des approches d'immunothérapie du GBM par transfert adoptif, en évaluant la faisabilité et le bénéfice thérapeutique de l'administration de différents types d'effecteurs immunitaires.

Des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2R γ [NOD.Cg-Prkd^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, NSG] seront utilisées comme modèle animal de développement de tumeurs GBM humaines, après greffe orthotopique. Ces souris recevront une administration intracrânienne d'effecteurs lymphocytaires T d'origine humaine qui seront des lymphocytes cytotoxiques, autologues ou allogéniques, activés en présence d'IL-2. Ces populations polyclonales de lymphocytes T, triées et amplifiées à partir d'échantillons sanguins de donneurs sains, seront des effecteurs sensibilisés contre des antigènes associés au GBM, contre des alloantigènes HLA, contre des épitopes du virus CMV ou modifiés génétiquement pour exprimer des récepteurs des molécules spécifiquement exprimées par les cellules tumorales GBM comme IL-13R α 2 ou HER-2 (activité ADCC, antibody dependent cell cytotoxicity). Des lymphocytes T V γ 9V δ 2 non-conventionnels, à forte activité cytolytique anti-tumorale, seront aussi testés dans cette étude. Seuls les effecteurs avec un fort potentiel thérapeutique seront utilisés (sélectionnés grâce à des tests de réactivités antitumorales in vitro).

Globalement, ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 550 à 1200 animaux (en fonction du nombre de modèles développés et du nombre d'effecteurs à valider dans différents modèles).

Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales.

- Développement de 5 à 10 modèles de GBM humaines (variable en fonction des caractéristiques de croissance de chacun). Chaque modèle nécessitera l'utilisation de 14 animaux.

- Mise au point des modalités d'injections des effecteurs T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (nombre, moment d'injection) (grâce au modèle de tumeur GBM le plus pertinent). Ces essais seront réalisés en utilisant une population lymphocytaire T effectrice « référence », préalablement sélectionnée pour sa forte réactivité anti-tumorale in vitro. Cette étape nécessitera l'utilisation de 10 lots de 5 souris.
- Evaluation du bénéfice thérapeutique de l'administration de différents effecteurs lymphocytaires T humains. Cette étape concernera 10 souris pour chaque effecteur T $\alpha\beta$ testé (18 populations), 45 souris pour les effecteur T ADCC (3 populations) et 30 pour les effecteurs T $\gamma\delta$ (5 populations).
- Confirmation de l'intérêt thérapeutique des effecteurs sur 1 à 2 autres modèles de GBM. Si les résultats obtenus précédemment sur le modèle de référence présentent un bénéfice en termes de survie, les effecteurs seront alors testés sur d'autres modèles de xénogreffes de GBM. Pour chaque modèle nous utiliserons 10 souris (lots contrôle et test en conditions optimales).

Nous utiliserons des lots de 5 souris et nous analyserons les résultats par tests statistiques de comparaison: test de Wilcoxon ou Mann-Whitney. D'un point de vue statistique, l'utilisation de plus d'animaux par lot semble préférable, nous sommes éthiquement amenés à tenter de réduire le nombre d'animaux utilisés. Plusieurs études publiées dans notre domaine de recherche, utilisant des modèles animaux similaires décrivent l'utilisation de 5 animaux par lot.

137- La cornée est l'organe le plus greffé dans le monde. Les pathologies endothéliales sont toujours associées à une baisse importante de la densité cellulaire endothéliale (DCE) liée au manque de capacité proliférative des cellules endothéliales cornéennes (CECs) in vivo. Une baisse importante de la DCE engendre une perte de transparence cornéenne qui ne peut être rétablie que par la réalisation d'une greffe de cornée. A cause de l'inefficacité des processus de réparation tissulaire, l'endothélium cornéen a longtemps été considéré comme un tissu non régénératif. Nous avons récemment publié une étude qui a soulevé une polémique sur l'existence de la régénération de l'endothélium cornéen chez adulte. Nos premières observations suggèrent que des cellules souches/progénitrices situées à l'extrême périphérie de l'endothélium cornéen pourraient être à l'origine d'une régénération très lente de CECs in vivo chez adulte compensant ainsi la diminution de la DCE (surtout à la périphérie de l'endothélium). Ces travaux ont besoin d'être poursuivi afin d'obtenir plus de résultats.

Le 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) est un nouvel analogue de la thymidine (un des éléments principaux de l'ADN) qui entre en compétition avec cette dernière lors de son incorporation à l'ADN au sein des cellules en division. Il remplace ainsi la Bromodeoxyuridine (BrdU) avec l'avantage d'une révélation plus facile techniquement. L'injection d'EdU chez le lapin suivie d'une fenêtre de 45 jours ou plus sans injection peut être utilisée pour présélectionner des cellules souches in situ grâce à son cycle cellulaire très long. Notre première approche sera d'injecter de l'EdU chez de jeunes lapins dans le but d'identifier et localiser pour la première fois les cellules souches/progénitrices spécifiques à l'endothélium.

Le lapin est irremplaçable dans ce projet qui doit se faire obligatoirement in vivo. Il est bien entendu impossible éthiquement de mettre en place un tel projet chez l'homme. Le lapin est le seul animal à présenter les deux critères suivants: la morphologie de sa cornée est proche de celle de l'homme et son endothélium cornéen possède une forte capacité de régénération, qui sont deux critères obligatoires pour que l'expérience soit un succès. Au total, 18 lapins sont potentiellement prévus pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs et prend en compte le risque que certains animaux puissent être exclus de l'analyse. Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale et chirurgie dans les règles de l'art pour l'injection et l'opération, suivi quotidien dans la semaine suivant l'opération, critères d'évolutions négatifs clairs de la cicatrisation définissant les cas où un traitement spécifique sera administré à l'animal), des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toutes souffrances inutiles à l'animal afin de le sortir le plus rapidement possible de l'expérimentation et donc de le soulager (perte de poids rapide, automutilations sévères, signes cliniques d'infection oculaire persistante malgré les traitements appliqués). Toutes les euthanasies des animaux seront effectuées de façon à limiter au maximum le stress et la douleur.

138- L'objectif de ce projet est de comprendre comment deux structures : la couche VIb du néocortex et le rhomboïde agissent sur les états d'éveil du néocortex. Ces deux structures ont la particularité d'être à la fois sensible aux agonistes cholinergiques et orexergiques. Ces deux molécules sont impliquées dans la modulation des états de vigilance, transition sommeil-éveil pour l'orexine et état actif ou passif pour l'acétylcholine. Nous chercherons à comprendre comment ces deux structures agissent sur le néocortex en état basal, en état excité et quand elles sont stimulées par l'orexine et l'acétylcholine.

Pour cela, nous utiliserons des rats de souche Wistar, nous estimons devoir utiliser 80 animaux au cours de ce protocole. L'étude d'une voie de connexion spécifique du cerveau nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être substituée. Néanmoins, nous réduisons au maximum le nombre d'animaux en cherchant à répondre à plusieurs points de notre projet scientifique par animal. Cela se traduit par l'application de plusieurs protocoles électrophysiologiques par neurone enregistré, et plusieurs neurones enregistrés par animal utilisé. De plus, l'analyse quotidienne des données permet une adaptation quotidienne des protocoles d'enregistrement et contribue à la réduction du nombre d'animaux utilisé.

139- Ce projet a pour but d'étudier les causes d'un des aspects d'une maladie rare chez l'homme et d'évaluer un protocole thérapeutique.

L'hypothèse est que, chez les patients déficitaires dans le métabolisme de la vitamine B12 et qui sont traités avec des doses quotidiennes très élevées de cette vitamine, la vitamine B12 provoque des effets secondaires néfastes pour la vision. Plus précisément, la vitamine B12 qui se trouve en excès dans l'œil produit des composés toxiques sous l'effet de la lumière qui provoquent petit à petit une perte de la vision.

Si cela est confirmé, nous testerons un nouveau traitement par thérapie génique dans l'œil, qui consiste à injecter le gène directement dans le muscle ciliaire de l'œil, ce qui permet de produire une protéine qui va permettre d'éliminer la vitamine B12 en excès, et donc d'éviter la phototoxicité.

Ces expériences nécessitent des rats de souche Long Evans, non génétiquement modifiés, et élevés dans des conditions de nourriture, de température et de lumière 12h obscurité/12h jour, normales. L'ensemble des expériences, qui représente à la fois les études de mécanisme et les études de thérapie, nécessite 120 animaux. Ce chiffre a été réduit au minimum en ne reproduisant aucune expérience à l'identique, mais en faisant varier les paramètres dans chaque lot d'animaux. Les différents protocoles mettent en jeu soit des injections de vitamine B12, soit en intramusculaire 5 jours par semaine pendant un mois, soit en une seule injection intraoculaire. Les expériences de thérapie nécessitent une seule injection intraoculaire du plasmide. Toutes les injections intraoculaires sont réalisées sous anesthésie générale, et les examens oculaires sont réalisés sous anesthésie locale de l'œil. Certains animaux seront illuminés pour montrer l'effet cytotoxique de la lumière. Une seule exposition d'une heure est suffisante.

140- Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'Homme. La forme la plus agressive est le glioblastome multiforme, avec une survie moyenne de 12 à 15 mois. Les traitements actuels qui associent la chirurgie et la radio/chimiothérapie, restent malheureusement non curatifs, souvent limités et manquent de spécificité. En effet, à ce jour le traitement de référence du glioblastome est le Témodal (témozolomide), un agent alkylant anti-tumoral. Cependant, il manque de spécificité et est la cause de nombreux effets secondaires, d'où l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler plus spécifiquement les cellules tumorales.

Au laboratoire, un peptide issu des neurofilaments, a révélé des propriétés antiglioblastome. Dans des cellules de glioblastomes humains ou de gliomes murins, ce peptide inhibe la prolifération cellulaire et induit une mort des cellules tumorales par apoptose. En revanche, il entre peu voire pas dans les cellules saines, de type neurones et astrocytes, dans lesquelles il n'a pas d'effet. Chez des animaux porteurs de gliomes, une injection simple de peptide, entraîne une réduction du volume tumoral.

Le potentiel thérapeutique de ce peptide, dans le traitement des tumeurs cérébrales de haut grade, pourrait être couplé au traitement de référence, le témozolomide, pour tenter de réduire de façon plus efficace le développement tumoral et ainsi améliorer la survie. Dans un second temps, l'intérêt thérapeutique de ce type de traitement nécessite l'évaluation in vivo de la toxicité potentielle au niveau local (cerveau) et au niveau périphérique du peptide seul ou associé au témozolomide. Cette approche nécessite une étude in vivo chez des animaux adultes (rats et souris), sains ou porteurs de gliomes, et traités avec le peptide (injecté en intraveineux ou en intratumoral) associé au témozolomide (administré par voie orale ou en intra-tumoral).

Cette expérimentation comporte 21 lots d'animaux avec 8 animaux par lot. Il est également préférable de prévoir des animaux supplémentaires (environ 10% du nombre total d'animaux nécessaires), soit $168 + 10\% = 185$ animaux. Nous allons étudier la toxicité chez les souris (185) et les rats (185), donc cela représente $185 \times 2 = 370$ animaux au total. Ce nombre d'animaux se justifie par l'utilisation d'une technique chirurgicale lourde et pour garantir des données statistiquement précises et représentatives de l'espèce. Il n'est pas utile de sacrifier plus d'animaux, mais il est préférable de ne pas en utiliser moins, au risque d'être confronté à de trop grandes variations entre des animaux d'un même lot. Après les injections, les animaux sont sacrifiés 30 jours (pour les rats) ou 21 jours (pour les souris) pour réaliser des analyses anatomo-pathologiques, hématologiques et biochimiques.

Les procédures utilisées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives n'impliquant pas d'animaux vivants. De plus, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées visent à réduire le plus possible toute forme de douleur, souffrance ou stress de l'animal.

L'ensemble des analyses permettra d'évaluer l'efficacité potentielle d'un traitement associant le peptide anti-glioblastome spécifique des cellules de gliome, et le témozolomide, un agent anti-tumoral bien connu. Les différentes analyses permettront également d'évaluer les éventuels effets toxiques du peptide couplé ou non au témozolomide, au niveau du cerveau ou au niveau des organes périphériques, en vue de futurs essais cliniques chez l'Homme.

141- Le projet vise à reproduire expérimentalement une infection gastro-intestinale à *Escherichia coli* chez le porcelet au sevrage. La colibacillose est une affection digestive fréquente chez le porcelet au sevrage, très répandue en élevage.

Le projet a pour objectif d'étudier la pathologie colibacillaire chez le porcelet au sevrage: caractérisation du modèle expérimental, étude d'efficacité, étude de cinétique, impact sur la flore digestive ...

Aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques des porcelets et permettront à ces derniers d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux.

Le bien être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires.

142- La caractérisation des premiers animaux résultant d'une invalidation complète de la NAPE-PLD a ouvert des voies concernant les implications de cette enzyme dans les voies métaboliques. Notre étude sur une soixantaine de souris par an porterait sur l'élimination tissu spécifique de cet enzyme qui devrait abolir la synthèse des 5 N-Acylethanolamides connus et abolir la perturbation locale du système endocannabinoïde ce qui devrait fournir des informations originales sur la fonction de ces composés sur la régulation centrale et périphérique de la balance énergétique. 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 et amélioration de leur environnement)

143- L'activité du laboratoire est orientée vers l'étude et la caractérisation des processus inflammatoires aigus et sévères qui rendent compte de la pathogénèse du neuropaludisme, des dommages systémiques qui sont explorables chez des souris de laboratoire auxquelles est inoculée *Plasmodium/P. berghei* ANKA, l'une des espèces plasmodiales de rongeur sauvage adaptée à la souris de laboratoire. Bien que le paludisme témoigne uniquement de la phase de développement asexuée intraérythrocytaire de *Plasmodium*, nous avons privilégié une approche intégrée reposant sur l'établissement intramuros du cycle complet de développement de *Plasmodium* chez les anophèles et chez les souris voire les rats de laboratoire. Pour identifier et caractériser les interactions voire la synergie entre i) les produits de gènes du mammifère modèle qu'est la souris de laboratoire et ii) les produits de gènes du parasite eucaryote qu'est *P. berghei*, rendant compte de l'amplification de processus inflammatoires systémiques et locaux- cerveau- Deux gènes de *P. berghei* seront plus particulièrement étudiés: 1) le gène *tctp* (Translationally Controlled Tumor Protein) dont le produit Histamine Releasing Factor (HRF) participe à l'amplification d'un processus inflammatoire de type allergique, au cours de la phase de développement intraérythrocytaire, 2) et l'un des gènes d'une famille multigénique spécifiant la synthèse des protéines HMGB (High Mobility Group Box proteins) déjà identifiées comme « facteurs de virulence » de *Plasmodium*. Ces deux protéines ont en commun des propriétés pro-inflammatoires puissantes. La mise en oeuvre de ce projet consiste à générer des populations de *P. berghei* déficientes ou non pour les gènes cités, populations qui seront inoculées aux souris. Seront suivis des signes cliniques traduisant des dommages au niveau du cerveau et des paramètres biologiques - dont les valeurs de la biomasse de globules rouges hôtes de *P. berghei* – Le nombre d'animaux estimé dans ce projet est d'environ 1080 souris.

144- Les nématodes gastro-intestinaux (NGI) sont des vers qui parasitent le tube digestif de leurs hôtes. L'utilisation massive d'antiparasitaires (anthelminthiques) pour lutter contre ces vers a conduit à l'émergence de parasites résistants. Actuellement les éleveurs d'ovins et caprins disposent de moins en moins de traitements efficaces contre ces parasites, De manière à proposer de nouvelles solutions thérapeutiques, nous développons au laboratoire deux grands thèmes de recherche visant à mieux comprendre comment les vers parasitent

leurs hôtes et comment ils réussissent à résister aux traitements actuellement utilisés, L'enjeu est majeur puisqu'actuellement tous les élevages ovins et caprins sont touchés par ces parasitoses et qu'aucune des molécules actuellement sur le marché n'est efficace à 100%, Le présent projet a donc pour objectif de produire les parasites utiles à nos analyses qui permettront de mieux comprendre les interactions entre les animaux et les parasites et, à terme, de pouvoir proposer de nouvelles méthodes de lutte qui soient efficaces, durables, respectueuses de l'environnement ainsi que de la santé et du bien être animal.

Dans le cadre de nos projets scientifiques, nous travaillons sur ovins essentiellement qui sont naturellement infestés par trois NGI : *Trichostrongylus colubriformis*, parasite de l'intestin grêle (duodénum), *Teladorsagia circumcincta* et *Haemonchus contortus* (parasites de la caillette), De manière à obtenir les parasites nécessaires à la réalisation de nos tests biologiques et moléculaires, nous avons besoin d'entretenir nos isolats sur leur hôte naturel, l'ovine, Le passage sur l'animal est une étape obligatoire du cycle parasitaire, Nous ne sommes pas en mesure de réaliser un cycle complet du parasite *in vitro*. Si l'espèce *Trichostrongylus* peut être multipliée sur lapin, ce que nous faisons lorsque c'est possible, les deux autres espèces sont en revanche spécifiques des ovins et caprins et nous avons choisi le mouton pour multiplier ces parasites.

Les multiplications représentent 250 animaux sur 5 ans, Les animaux sont âgés de 3-4 mois, âge auquel le système immunitaire est suffisamment développé pour tolérer la présence de vers dans le tube digestif et pas encore trop développé pour rejeter totalement les parasites que nous utilisons. Tous les animaux sont infestés de la même façon. Nous faisons ingérer des larves infestantes (voie naturelle de contamination) à 1 ou 2 moutons par souche à multiplier selon les besoins (il n'y a pas d'analyse statistique à l'issue du protocole de multiplication), Cet effectif nous donne assez de matériel biologique pour réaliser nos tests biologiques et moléculaires. La dose de larves inoculée (10000 larves) ne provoque pas d'effet clinique sur les animaux, Les parasites se développent au niveau du tube digestif, pouvant entraîner une légère inflammation en tout début d'infestation. Le traitement de la douleur liée à cette inflammation reviendrait à se débarrasser du parasite par un traitement anthelminthique ou à traiter l'inflammation ce qui est incompatible avec le protocole qui vise à obtenir un cycle complet du parasite *in vivo*, Les animaux sont toujours hébergés par deux et sont en contact visuel avec leurs congénères des cases voisines et ont à disposition un aliment riche en fibre afin de satisfaire leur besoin alimentaire et de rumination.

145- La maladie de Parkinson (MP) est une affection neurologique qui induit des troubles moteurs mais également des troubles du comportement. Notamment, les traitements pharmacologiques de la maladie peuvent induire un phénomène de dépendance et des addictions comportementales aux conséquences dramatiques. De manière intéressante, il semble qu'un antécédent d'alcoolisme soit un facteur de risque pour l'apparition d'une MP précoce et de ces troubles du comportement. Mais les mécanismes pathologiques restent incompris et difficiles à étudier en clinique. C'est pourquoi nous proposons d'étudier l'interaction entre l'alcool et la MP d'un point de vue comportemental et neurobiologique chez le rat car il est un modèle reconnu de la MP pour lequel il existe des procédures de consommation excessive d'alcool bien validées.

L'avantage principal de ce projet de recherche fondamentale est la mise en place d'une approche innovante permettant de comprendre un mécanisme pathologique touchant une partie significative de la population et qui pourtant reste sous-étudié: la compréhension de ces mécanismes fournira des éléments importants pour établir de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'aspect le plus dommageable du projet est la mise en place d'un état pathologique chez le rongeur avec de la chirurgie lésionnelle de classe modérée.

Le projet est composé de 4 procédures expérimentales différentes et requerra l'utilisation de 506 rats.

146- L'allergie aux acariens est la plus fréquente des allergies respiratoires de l'enfant. On estime à plus de 15% l'incidence de l'allergie aux acariens chez les enfants en Europe et aux Etats-Unis. Lors des allergies respiratoires chez le jeune enfant, les sociétés savantes préconisent un traitement le plus précoce possible afin de prévenir les complications respiratoires telles que l'asthme, les bronchites sifflantes et la rhinite allergique. La désensibilisation (ou immunothérapie spécifique) est reconnue par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) comme le seul traitement de fond de l'allergie.

Utilisée précocement, elle permettrait d'éviter l'apparition de nombreuses complications respiratoires ou cutanées d'autant plus que 70% des asthmes débutent avant 6 ans.

Malheureusement, les solutions classiques de désensibilisation (injections par voie sous-cutanée ou administration sublinguale) ne sont pas recommandées par l'OMS pour l'usage chez les jeunes enfants étant donné les risques (mauvaise tolérance, voie orale non adéquate avant 6 ans, ...).

Dans ce cadre, ce projet a pour objectif principal de mettre au point un produit de désensibilisation épi cutanée (Viaskin® HOM) qui permettra pour la première fois de désensibiliser sans risque les jeunes enfants allergiques aux acariens, afin de prévenir l'asthme et les manifestations de l'allergie respiratoire. La méthode épi cutanée étant une méthode totalement adaptée à l'enfant dès le plus jeune âge pour sa simplicité d'utilisation et sa non-invasivité (pas de douleur associée à l'application). Dans ce projet, nous allons évaluer dans différents modèles animaux, l'efficacité du produit, l'effet dose d'action du produit, les mécanismes d'actions mis en jeu et la tolérance locale du produit (étude de toxicologie). Nous projetons d'utiliser 324 souris BALB/c femelles de 5 semaines pour les études de pharmacologie (efficacité et mécanismes d'action) et 8 lapins néo-zélandais (4 mâles et 4 femelles) pour les études de tolérance locale du dispositif épicutané.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un grand projet collaboratifs ISI OSEO permettant la conception du produit pharmaceutique, son évaluation préclinique et la réalisation d'une étude clinique de phase 1.

147- Objectif du projet: Evaluer l'activité pharmacologique in vivo de nouvelles entités chimiques après administration par voie topique ou systémique chez le rat ou chez la souris.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de démontrer l'activité pharmacologique in vivo en lien avec le mécanisme d'action ciblé et de définir une dose efficace reliée à un niveau d'exposition dans le tissu cible. Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates et au choix des doses à utiliser chez l'homme pour les indications thérapeutiques visées comme le psoriasis et les lésions précancéreuses et cancéreuses de la peau.

Dommages escomptés: En fonction des cibles pharmacologiques, il pourra être nécessaire d'induire une réponse biologique chez l'animal dans le but d'activer ou d'augmenter l'expression de la cible moléculaire concernée. Ces stimuli sont susceptibles d'induire une réaction inflammatoire légère au niveau de la peau qui sera maîtrisée par le choix des doses du stimulus utilisé et par l'utilisation d'un produit analgésique si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux.

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

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

-Choix des espèces: Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses ex vivo spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes.

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (biochimie, biologie moléculaire, morphologie, etc. ...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, 3 à 10 animaux par groupe expérimental seront utilisés pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés. Pour chaque procédure expérimentale, le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée. Un maximum de 60 animaux sera utilisé par étude et un maximum de 30 études par an sera réalisé, soit un total de 9000 animaux sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux.

148- Le sarcome d'Ewing est un cancer de l'os atteignant les enfants avec une médiane à 15 ans, Il a été décrit dans ce type de cancer la présence d'une translocation chromosomique entre les gènes EWS et Fli1 aboutissant à l'expression d'un oncogène responsable de l'apparition de la maladie, Nous avons montré que de petits ARN interférents (siARN), dont la séquence est complémentaire de l'ARN messenger de cet oncogène, sont capables de bloquer spécifiquement son expression lorsqu'il pénètre dans les cellules cancéreuses, Toutefois, ces siARN sont dégradés dans les milieux biologiques et n'entrent pas spontanément dans les cellules, C'est pour cela, que nous avons développé des nanovecteurs capables de les transporter dans les cellules.

Ces nanovecteurs sont à base de squalène qui est déjà utilisé dans des préparations pharmacologiques, et dont il a été montré qu'il pouvait s'organiser spontanément en nanoparticules lorsqu'il est dispersé dans une solution aqueuse, Le siRNA pourra être transporté par ce nanovecteur soit après fixation covalente sur le squalène soit par interaction électrostatique sur un dérivé du squalène portant des charges électriques complémentaires à celles du siARN Nous avons montré dans le laboratoire, que ces siARN vectorisés entrent dans les cellules et sont capables d'inhiber la croissance des cellules ainsi que celle de l'oncogène visé tant au niveau de l'expression de l'ARN messenger que de la protéine correspondante, Notre projet est de mesurer la capacité de

ces siARN vectorisés à inhiber la croissance de tumeurs implantées chez la souris et de comparer l'efficacité des différents types de vecteurs développés. La mesure de la taille des tumeurs sera suivie au cours du traitement. L'inhibition de l'expression du gène cible dans les tumeurs tant au niveau de l'ARNm et que la protéine EWS-Fli1 sera recherchée en fin d'expérience sur les tissus prélevés. L'association de ce traitement avec des composés pharmacologiques de chimiothérapie utilisés dans le traitement du sarcome d'Ewing (doxorubicine, vincristine, ifosfamide, ...) sera effectuée afin de rechercher une amélioration de l'efficacité du traitement. Pour la réalisation de l'ensemble de cette étude d'une durée de 5 ans, de l'ordre de 750 souris seront utilisées. Leur nombre pourra être diminué en fonction des résultats obtenus au cours des études préliminaires prévues dans ce projet.

149- Nous avons récemment caractérisé une nouvelle protéine nommée ARHGAP19 dont nos expériences dans des cellules en culture in vitro démontrent qu'elle joue un rôle dans la division cellulaire. L'extinction de ce gène dans des lymphocytes humains induit des défauts de mitose et des anomalies de la séparation des chromosomes. Nos résultats actuels indiquent qu'ARHGAP19 pourrait être spécifique du système hématopoïétique. Pour comprendre quel est le rôle de cette protéine sur la génération des cellules sanguines et sur le développement des cellules du système immunitaire nous souhaitons développer un modèle de souris dans lequel le gène pourra être inactivé. Le projet visera à entretenir une lignée de souris fondatrices dans lesquelles le gène est entouré de deux séquences Lox, puis à les croiser avec des souris exprimant la recombinaison CRE. Les effets développementaux ainsi que ceux sur le système hématopoïétique/immunitaire seront analysés chez les souris issues de ces croisements dans lesquelles le gène aura été inactivé par recombinaison homologe.

Ce projet implique le maintien d'animaux transgéniques en élevage. Seul 1/4 des animaux produits sera utilisable (75% de génotype inadapté). 7 élevages doivent être menés à bien. Le nombre total d'animaux utilisés est de 678 souris.

Des expérimentations in vitro ont été menées en amont de ce projet afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Les couples des élevages sont optimisés pour produire une quantité d'animaux suffisant pour une interprétation statistique solide des résultats. Chaque animal est analysé plusieurs fois afin de réduire le nombre total d'animaux/groupe et d'augmenter la puissance statistique des résultats (chaque animal étant son propre témoin) Les animaux sont surveillés quotidiennement et leur hébergement est enrichi de cocoon et de maisons en carton. La réactivité à un changement comportementale, une perte de poids ou tout autre signe de détresse permettra de limiter la souffrance soit par administration d'un produit adapté (nourriture enrichie, antalgique ou antibiotique), soit par euthanasie si aucune autre solution n'est envisageable.

150- La mise en place de l'obésité chez l'Homme s'accompagne de modifications du fonctionnement cérébral, et notamment d'anomalies au niveau du circuit de la récompense. Des anomalies ont été repérées au niveau du striatum, la région du cerveau qui contient la plus grande population de neurones à dopamine. La dopamine est un messager chimique, qui intervient dans la communication entre les neurones. Des études ont montré que la consommation excessive de sucre peut justement provoquer des anomalies au niveau du système dopaminergique, et que différents sucres peuvent avoir différents effets. L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de différents régimes (riches en glucose, en fructose ou en amidon), consommés de manière chronique, sur la neurotransmission dopaminergique. Le modèle porcin, et plus particulièrement le modèle miniporc, est un excellent modèle d'étude en nutrition et neurosciences. En comparant trois différents groupes d'animaux nourris pendant deux mois avec trois régimes obésogènes différents, nous pourrions savoir si les régimes hyper-sucrés (riches soit en glucose, soit en fructose) sont susceptibles d'induire les anomalies décrites plus haut, en comparaison d'un régime riche en amidon. Pour explorer la neurotransmission dopaminergique au niveau cérébral, nous utiliserons une méthode de référence non invasive chez l'Homme, l'imagerie DATscan par scintigraphie cérébrale. Une telle étude, irréalisable chez l'Homme pour des questions éthiques, permettra d'identifier le caractère délétère du sucre (voire d'un sucre en particulier) pour une fonction cérébrale bien précise, connue pour être impliquée dans l'obésité et les comportements addictifs. Sur la base des études réalisées en DATscan pour évaluer d'autres états pathologiques chez l'homme, nous nous proposons d'utiliser 3 groupes de 8 animaux chacun. De plus, pour cette expérience qui sera une première chez le porc, nous avons besoin d'avoir des données de référence pour recalibrer nos images par rapport à un atlas tridimensionnel et c'est pourquoi nous débuterons par acquérir sur 10 animaux témoins des images de référence de la fonction dopaminergique.

151- La maladie de Parkinson est une affection neurologique d'origine incertaine, provoquée par la destruction progressive d'une sous-population de cellules nerveuses, les neurones dopaminergiques. L'objectif de ce projet est d'étudier, grâce à des modèles cellulaires de cette maladie, les mécanismes spécifiques qui sous-tendent cette perte neuronale, en explorant, en particulier, le rôle causal que pourrait avoir une dyshoméostasie calcique. A terme, la finalité de ce projet sera de déterminer si des molécules qui préservent l'homéostasie calcique, sont capables de protéger les neurones dopaminergiques vulnérables dans un contexte physiopathologique.

La stratégie des 3R sera pleinement respectée. Les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre minimum de souris/rats pour une analyse statistique adéquate des résultats. La classe de gravité est classée sans réveil, la procédure expérimentale consistant à injecter une surdose d'anesthésique afin d'euthanasier les animaux. Mettant en jeu des interactions neurones/cellules gliales qui sont très probablement impliquées dans la pathologie modélisée, la maladie de Parkinson, notre modèle cellulaire ne peut pas être remplacé par un système plus simple comme par exemple une lignée cellulaire. Le nombre d'embryons Wistar (E15) prévu pour la réalisation de ce projet est de 1200/an, soit sur 3 ans 3600 (360 femelles gestantes). Le nombre d'embryons de souris C57Bl6 pour compléter la caractérisation effectuée sur les cultures de mésencéphale de rat est de 800 (160 femelles gestantes sur la totalité du projet).

152- Les ruminants sont susceptibles d'être utilisés à des fins expérimentales, tant dans le domaine de la recherche agronomique que de la recherche biomédicale et il est fondamental que les principes vétérinaires de soins anesthésiques et analgésiques de ces animaux soient respectés par les expérimentateurs. La formation permettra de mieux appréhender l'évaluation de la douleur dans ces espèces par la reconnaissance de signes cliniques fiables pour ensuite adapter au mieux un protocole thérapeutique efficient en intensité et en durée. Il sera abordé également les caractéristiques de l'acte anesthésique de ces animaux (tranquillisation, anesthésie fixe, anesthésie gazeuse) ainsi que le monitoring indispensable à une bonne surveillance des paramètres vitaux.

La surveillance du réveil, les modalités de préparation des animaux et les particularités de ces espèces seront également enseignées durant ces deux jours. Les deux matinées seront réservées à des présentations théoriques alors que les travaux pratiques sur brebis et génisses de 2 ans auront lieu les deux après-midis. Deux brebis adultes et deux génisses entre 2 et 3 ans recevront des injections d'anesthésiques et analgésiques selon différentes voies (intraveineuse, intramusculaire, rachidienne, ...). Les produits injectés seront des médicaments vétérinaires disposant tous d'une Autorisation de Mise sur le Marché pour les espèces considérées.

153- Les galectines sont une famille de protéines impliquées dans de multiples processus normaux et pathologiques, notamment le cancer. Cependant, leur mode d'action reste extrêmement mal compris.

Notre démarche consiste à analyser avec précision les défauts des souris qui possèdent des mutations sur ces gènes, puis sur la base des observations faites chez l'animal, choisir un modèle cellulaire approprié pour analyser le mécanisme d'action impliqué. Par cette analyse génétique, effectuée chez la souris, nous voudrions comprendre les véritables fonctions de ces protéines. Cette démarche se distingue radicalement des nombreux travaux effectués exclusivement à l'aide de cellules en culture.

Les galectines étant naturellement présentes dans plusieurs tissus cibles, les mutations ont des effets multiples et, de ce fait, le projet présente plusieurs axes.

Deux grands axes seront développés.

Le premier est centré sur les cellules épithéliales de la peau, et des systèmes: respiratoire, gastro-intestinal et urogénital. Les questions sont:

- comment les galectines interviennent elles dans le cycle cellulaire? les souris seront injectées avec un marqueur de la prolifération avant le sacrifice.

- comment les galectines interviennent elles dans la migration cellulaire? cette question sera analysée dans le cadre de la fermeture d'une égratignure effectuée à la surface de la peau.

Le second axe vise à élucider le rôle des galectines dans les pathologies, osseuses et plus particulièrement sur l'arthrose. Ce volet implique l'ablation du ménisque (ménisectomies) pour déclencher l'arthrose sur de jeunes souris.

Nous estimons que l'ensemble des expériences prévues pour les 5 années à venir impliquera au maximum 942 souris expérimentales, tous stades confondus: fœtal, postnatal, jeunes et vieux adultes. Cependant, l'analyse statistique des données se fait au fur et à mesure que les résultats sont obtenus. S'il s'avère que la réponse à la question initialement posée est statistiquement validée avec un plus petit effectif (par exemple avec seulement 8 ou 9 animaux opérés au lieu (des 12 initialement prévus), alors l'expérience sera arrêtée.

154- Les plaquettes sanguines, élément crucial de l'hémostase exprime principalement des Ca^{2+} ATPases de type intracellulaire et en particulier les SERCA de type 3. Le signal calcique plaquettaire qui se présente sous la forme d'oscillation très précise conduisant à l'activation de différents récepteurs, est essentiel à de nombreux processus d'activation plaquettaire. Nous nous proposons, dans ce projet, d'étudier l'implication des Calcium ATPases réticulaires de type 3 (SERCA3), dans l'activation plaquettaire (agrégation, formation du thrombus dans des conditions physiologiques et dans la thrombose dans des modèles in vitro et in vivo).

Résultats espérés : Nous avons observé en parallèle que les plaquettes de sujet atteint d'obésité morbide n'exprimaient plus les SERCA3 et que cela s'accompagnait d'un défaut d'activation plaquettaire. L'étude dans un modèle in vivo chez la souris qui n'exprime pas la protéine SERCA3 permettra de déterminer la spécificité de ces protéines dans les mécanismes d'activation plaquettaire. Dans ce projet, nous regarderons si la protéine SERCA3 joue également un rôle dans la formation du thrombus. Par ailleurs, nous étudierons le rôle de SERCA3 dans l'adhérence des plaquettes au vaisseau qui constitue la première étape de la formation du thrombus et dans l'agrégation des plaquettes entre elles qui constituent la seconde étape. Le but de cette étude étant de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques antithrombotiques.

155- Le squalène est un composé naturel à l'origine de la synthèse du cholestérol chez le requin, qui forme spontanément des nanoparticules de 100 à 300 nm de diamètre. Le couplage chimique du squalène à des petites molécules médicamenteuses hydrophiles ("processus de squalénisation") permet d'obtenir des nanoparticules, et ainsi d'injecter des molécules normalement instables dans le torrent circulatoire par voie intraveineuse.

De plus, il a été observé que ce procédé de squalénisation permettait d'améliorer la pénétration intracellulaire des principes actifs.

Ainsi, l'utilisation de telles nanoparticules permettra l'administration par voie intraveineuse de principes actifs à ce jour inutilisables suite à leur instabilité dans le sang, et de diminuer la résistance des cellules à certains traitements. Afin de pouvoir développer une telle approche, l'étude de la pharmacocinétique, de la biodistribution et de l'interaction avec les lipoprotéines plasmatiques de ces nanoparticules squalénisées est essentielle afin de connaître et de maîtriser les quantités de principe actif circulant dans le sang et internalisées par les organes après injection. Cette étude permettra une meilleure maîtrise de la dose

injectée, permettant ainsi d'optimiser l'obtention d'un effet pharmacologique significatif tout en évitant tout phénomène de toxicité. Pour réaliser cette étude, des bioconjugués radiomarqués obtenus par conjugaison covalente de la molécule radiomarquée (marquage au tritium ou au carbone 14) d'intérêt (e.g. emcitabine, adénosine, doxorubicine etc.) au squalène ont été synthétisés.

156- Le couplage chimique de terpénoïdes naturels ou de synthèse (polyisoprénoïdes) à des principes actifs anticancéreux, entraîne la formation de bioconjugués qui ont la capacité de s'auto-organiser sous forme de nanoparticules en milieu aqueux. Ces "nanomédicaments" sont capables de protéger la molécule active de la dégradation par les enzymes de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible, et d'en contrôler la libération, permettant ainsi de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre les cancers. L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de ces nanomédicaments doit être précédée par la détermination de la dose maximale tolérée pour chacun des nanomédicaments étudiés. Cette étude est fondamentale afin de pouvoir déterminer la dose la plus efficace avec une tolérance satisfaisante.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Les essais in vitro sont préférés, si possibles, afin de remplacer l'expérimentation animale. Néanmoins le remplacement ne peut pas toujours être proposé. Jusqu'à présent, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète et donc il n'est pas possible les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques. Certaines études doivent donc être menées sur des animaux entiers.

Les études préliminaires in vitro permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé in vivo, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance et le degré de souffrance des animaux sera toujours minimisé. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles. L'entretien des animaux sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées et surveillées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Pour la réalisation de cette étude nous utiliserons des souris femelles athymiques nude (nu/nu) Ces souris sont caractérisées par l'absence de thymus, la glande qui produit les lymphocytes T. Par conséquent, elles sont incapables de rejeter les cellules humaines qui seront implantées pour le développement de modèles de tumeurs successivement utilisés pour les études d'efficacité anticancéreuse.

Dans le cadre du développement de modèles de tumeur en utilisant des cellules cancéreuses murines, des souris femelles balb/c seront utilisées.

Pour la réalisation de ces études, le nombre total d'animaux estimé sur les 5 années est de 1050 souris.

157- Le couplage chimique de terpénoïdes naturels ou de synthèse (polyisoprénoïdes) à des principes actifs anticancéreux, entraîne la formation de bioconjugués qui ont la capacité de s'auto-organiser sous forme de nanoparticules en milieu aqueux. Ces "nanomédicaments" sont capables de protéger la molécule active de la dégradation par les enzymes de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible, et d'en contrôler la libération. Afin de pouvoir proposer ces nanomédicaments comme nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre les cancers, une évaluation de leur efficacité anticancéreuse sur des modèles de cancers expérimentaux doit être conduite.

Les expériences seront menées selon les règles européennes (86/609/CEE et 2010/63/UE) et les principes de protection des animaux de laboratoire et de la législation en vigueur en France (décret n° 2013-118 du 1 Février 2013).

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche. Les essais in vitro sont préférés, si possibles, afin de remplacer l'expérimentation animale. Néanmoins le remplacement ne peut pas toujours être proposé. Jusqu'à présent, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète et donc il n'est pas possible les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques. Certaines études doivent donc être menées sur des animaux entiers.

Les études préliminaires in vitro permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé in vivo, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une diminution du nombre d'animaux utilisés sera également réalisée avec une planification statistique minutieuse de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance et le degré de souffrance des animaux sera toujours minimisé.

Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles. Chaque animal aura un espace suffisant. L'entretien des animaux sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées et surveillées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Les différentes procédures sont parfaitement standardisées. Néanmoins nous sommes amenés à déterminer des points limites dans nos expérimentations. A cet égard, les animaux seront euthanasiés avant la fin établie de l'expérience si un ou plus des points limites se vérifient.

Les travaux de recherche seront effectués uniquement par des personnes formées et pleinement autorisées par les organismes vétérinaires nationaux pour réaliser ces études d'expérimentation animale,

Pour la réalisation de cette étude nous utiliserons des souris femelles (4 - 6 semaines) athymiques nude. Ces souris sont caractérisées par l'absence du thymus la glande qui produit les lymphocytes T. Par conséquent, elles sont incapables de rejeter les cellules humaines qui seront implantées pour le développement de modèles de tumeurs. Dans le cadre du développement de modèles de tumeur en utilisant des cellules cancéreuses murines, des souris femelles balb/c seront utilisées.

Pour chaque étude, on prévoit d'utiliser 40 souris (40 études estimées sur 5 ans) ce qui correspond à un nombre total estimé de 1600 souris sur 5 ans.

158- Le couplage chimique de terpénoïdes naturels ou de synthèse (polyisoprenoïdes) à des principes actifs anticancéreux, entraîne la formation de bioconjugués qui ont la capacité de s'auto-organiser sous la forme de nanoparticules en milieu aqueux. Ces "nanomédicaments" sont capables de protéger la molécule active de la dégradation par les enzymes de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible, et d'en contrôler la libération. Afin de pouvoir proposer ces nanomédicaments comme nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre le cancer du pancréas, une évaluation de leur efficacité anticancéreuse sur des modèles adéquats de cancer expérimental doit être conduite. En particulier, nos études seront conduites sur un modèle de greffe orthotopique obtenu par l'implantation de cellules tumorales dans le tissu d'origine. Ce modèle permet de développer des tumeurs plus proches de la pathologie observée chez l'homme et également de mieux reproduire les différentes séquences du développement tumoral : développement de la tumeur primaire au niveau de son tissu d'origine puis essaimage à distance avec la formation de métastases.

Le cancer pancréatique représente la cinquième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. Par ailleurs, il est actuellement acquis que la plupart des cancers pancréatiques sont caractérisés par une vascularisation réduite et une production importante de matrice extracellulaire qui réduisent de manière très importante l'accessibilité des médicaments anticancéreux à la tumeur. Dans ce contexte, nos études pourront permettre l'émergence de nouveaux traitements avec une efficacité accrue.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche. Néanmoins le remplacement ne peut pas toujours être proposé. Il n'est pas possible de reproduire exactement les organismes vivants en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques donc certaines études doivent être menées sur des animaux entiers.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance et le degré de souffrance des animaux sera toujours minimisé. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles. L'entretien des animaux sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Les différentes procédures sont parfaitement standardisées. Néanmoins nous sommes amenés à déterminer des points limites dans nos expérimentations. A cet égard, les animaux seront euthanasiés avant la fin établie de l'expérience si un ou plus des points limites se vérifient.

Pour la réalisation de cette étude nous utiliserons des souris femelles athymiques nude. Ces souris sont caractérisées par l'absence du thymus la glande qui produit les lymphocytes T. Par conséquent, elles sont incapables de rejeter les cellules humaines qui seront implantées pour le développement du modèle orthotopique du cancer du pancréas.

Pour ces expériences on estime utiliser 930 souris sur les 5 ans.

159- La maladie d'Alzheimer (MA) est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des facultés cognitives. Au niveau histologique, la maladie se caractérise par la présence dans le cerveau de plaques séniles extracellulaires enrichies en peptide amyloïde (A β) et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires contenant la protéine Tau hyperphosphorylée. Le modèle de souris triple transgéniques 3xTgAD (PSM_{146V}, APP_{Swe}, Tau_{P301}) que nous utilisons au laboratoire, mime au mieux la MA puisque ces souris développent non seulement des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires mais aussi des déficits synaptiques et cognitifs.

Récemment nous avons observé dans ce modèle, une accumulation précoce d'un fragment pathogène, le C99 qui est le précurseur du peptide A β . Cette accumulation est associée temporellement à un phénotype de type apathique qui se traduit par une diminution de l'activité générale des souris. Ce comportement apparaît dès l'âge de 3 mois bien avant les premières altérations de la mémoire. De manière intéressante, l'apathie est un état mental précoce des patients atteints de MA et jusqu'ici, il n'a jamais été documenté dans un modèle de souris Alzheimer.

Notre principal objectif est de comprendre pourquoi et comment le C99 s'accumule et si cela peut être responsable du phénotype apathique précoce observé chez ces souris modèle de la MA. Notre projet scientifique devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la MA et apporter des informations et des précautions importantes pour toute stratégie thérapeutique future.

Pour ce projet de 5 ans et dans le respect de la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) 3750 souris seront utilisées.

160- Le présent projet a pour cadre le développement d'un nouveau médicament. Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales de pharmacocinétique en dose unique et en doses répétées, de distribution tissulaire et de métabolisme menées chez le chien. Il est conçu pour être répété en totalité ou partiellement pour chaque produit testé. Il permet d'obtenir les informations relatives à l'absorption, à la distribution, au métabolisme et à l'élimination du principe actif étudié, nécessaires pour confirmer, le cas échéant, la pertinence de l'espèce chien pour les études de toxicologie, pour contribuer à la sélection des doses, fréquence et voie d'administration pour les études de toxicologie lorsque l'espèce retenue est le chien, pour contribuer à la sélection de la première dose à administrer lors des essais cliniques chez l'Homme, pour contribuer à la mise au point et la sélection de formulations précliniques ou cliniques et constituer les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments auprès des autorités de santé.

Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standard), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux exigences réglementaires et/ou aux pratiques reconnues par la communauté scientifique. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une ou plusieurs procédures expérimentales dans le cadre de l'évaluation d'un candidat médicament. Il précise les éléments spécifiques comme le calendrier, les conditions de traitement (voie, dose, fréquence) et d'examen, les gestes techniques. Les effectifs prévus sont les effectifs usuellement utilisés pour ce type d'étude et permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente.

Il est prévu d'héberger 12 chiens continuellement pour être utilisés plusieurs fois dans les procédures décrites dans le présent projet. Ils seront remplacés périodiquement tous les 6 mois à

2 ans, en fonction du nombre de procédures expérimentales réalisées et de leur classe de gravité réelle. Dans tous les cas, la décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par un vétérinaire, pour autant que les conditions de l'Arf.R.214-13 du Code rural et de la pêche maritime soient remplies. Le nombre maximum prévu d'animaux utilisés dans ce projet est de 120 chiens sur une durée de 5 ans.

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

Ce projet prévoit également la formation et/ou le perfectionnement des praticiens impliqués ainsi que la possibilité de recueillir du sang ou des urines dans le but de préparer des matrices témoins utilisées pour le dosage des échantillons générés dans ce projet.

161- Les tests décrits dans ce projet concernent l'inflammation du système respiratoire dans le cadre de développement préclinique de produits pharmaceutiques. La bléomycine (antibiotique anti-cancéreux) est utilisée en tant qu'agent réactif et est administrée par instillation intra-trachéale, provoquant ainsi un endommagement de l'épithélium pulmonaire suivi d'une réponse inflammatoire et d'une réparation excessive des tissus qui conduit à une fibrose.

L'objectif de ce projet est dans un premier temps de valider le modèle en caractérisant l'histoire naturelle de la maladie chez la souris ou le rat. Les paramètres respiratoires (pléthysmographie corps entier), les marqueurs d'inflammation et de fibrose (IL-6, TNF- α et TGF- β), l'infiltration cellulaire (éosinophiles, macrophages, neutrophiles ou lymphocytes) ainsi que l'histopathologie des poumons seront évalués à deux temps, i.e. à la fin de la phase d'inflammation (vers 9 jours après l'administration de bléomycine) et à la fin de la phase de fibrose (vers 14 jours).

Une fois le modèle caractérisé, des études pharmacologiques seront menées sur ce modèle. L'objectif de ce type d'étude étant de développer une inflammation, aucune médication (notamment anti-inflammatoire) ne pourra être utilisée, celle-ci risquant de compromettre les résultats de l'étude. Néanmoins, un suivi des points limites (courbe de poids, respiration, appétit) permettant de sacrifier l'animal pour éviter toute souffrance inutile sera mis en place.

Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux (rongeurs principalement) et ne peuvent être remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation de rongeurs est justifiée par le fait que le développement des modèles décrits dans ce projet inclut l'évaluation des paramètres respiratoires, tests validés essentiellement chez les rongeurs. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à intégrer dans une même expérience la relation dose-effet, la comparaison par rapport à une substance de référence, et une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition du test. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le volume d'animaux utilisés. Sur ces modèles induits, un effectif de 10 animaux par groupe pour chaque paramètre et chaque stade évalué semble un minimum (i.e. environ 100 animaux par étude). Par ailleurs, nous estimons à 7 le nombre de molécules qui seront testées par an et par espèce, sur les 3 prochaines années (i.e. 2000 rats, 2000 souris).

162- Contrôle de l'absence ou de l'inactivation d'un agent toxique dans le cadre du développement d'un produit pharmaceutique à usage vétérinaire chez une espèce de mammifère domestique.

Après recherches bibliographiques aucun modèle in vitro ne peut permettre de garantir l'absence ou l'inactivation de l'agent toxique contenu ou non dans notre produit. En effet, d'autres agents contenus dans notre produit sont susceptibles de provoquer les effets décrits in vitro ce qui rend aspécifique un tel modèle. Le développement d'un modèle in vivo décrit dans la littérature s'impose donc et le choix s'est porté sur le modèle décrit dans la Pharmacopée Européenne humaine pour un produit équivalent au nôtre.

Le dit agent toxique provoque des signes cliniques identifiables et spécifiques dans un temps court après injection sur souris jeunes.

Des souris non sevrées sont préconisées à raison de 5 animaux par groupe, chaque étude comportera 3 à 5 groupes/par lot de produit.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera au maximum de 918.

Ce test spécifique sur rongeurs est effectué dans le cadre de la validation du procédé de fabrication du produit vétérinaire et permettra de garantir sa non toxicité. Ceci est un préalable avant tout essai d'innocuité et d'efficacité sur l'espèce de destination.

163- Suite à l'évolution des textes de la Pharmacopée Européenne dans le cadre d'une procédure d'extension d'AMM (reconnaissance mutuelle), le dossier d'autorisation de mise sur le marché concernant un produit immunologique destiné à

protéger une espèce de carnivore domestique, contre les pathologies majeures du terrain, doit faire l'objet d'essais complémentaires.

Ce projet est conçu en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne, et requiert la mise en oeuvre de procédures expérimentales liées à l'évaluation de la tolérance du produit.

Ce projet est également conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment:

- Ces procédures ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales car elles répondent à l'obligation réglementaire de les conduire sur l'espèce de destination et à l'âge minimum préconisé pour le traitement,

- le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum car 2 procédures seront conduites en une seule. Au total, 2 procédures seront conduites au lieu des 3 requises. Ainsi, le nombre d'animaux envisagé ne sera pas supérieur à celui déterminé par la réglementation, et sera de 32 au maximum.

164- Afin de pouvoir identifier et localiser les molécules formées au sein des cellules d'un tissu, d'un organe ou les mesurer si elles sont sécrétées dans un fluide biologique, de nombreuses méthodes de dosage utilisent les propriétés des anticorps afin de détecter les molécules recherchées. Les anticorps sont des protéines complexes produites par les lymphocytes B du système immunitaire pour neutraliser des agents pathogènes.

Les anticorps, ou immunoglobulines, sont produits par l'organisme en réponse à l'introduction d'un antigène. Chaque immunoglobuline est spécifique d'un épitope de l'antigène. et lors de l'immunisation contre un antigène plusieurs épitopes sont utilisés pour générer des anticorps qui, en conséquence, seront polyclonaux. La spécificité d'un anticorps est la principale des propriétés qui est exploitée pour détecter une molécule

Lors des processus d'immunisation, la spécificité sera plus ou moins grande selon la nature de l'épitope de l'antigène qui générera l'anticorps et selon la réponse individuelle de l'animal en cours d'immunisation. C'est pourquoi, les procédés d'immunisation font appel à trois animaux par antigène dans le présent projet. La production d'anticorps sera effectuée chez la chèvre femelle âgée d'au moins six mois dont le poids (50 à 70kg) permet de collecter le volume de sang (200 à 400 ml) nécessaire au projet sans occasionner de stress ni altérer la santé de l'animal. Les chèvres sont maintenues dans les conditions usuelles de l'élevage caprin dans la structure d'expérimentation et d'élevage de l'INRA. Les antigènes sont des peptides de synthèse ou des protéines d'extraction naturelle. Ils sont administrés par injection sous cutanée ou intradermique et associés à un adjuvant afin de faciliter la réponse immunitaire. Plusieurs injections de rappel effectuées à intervalle de trois semaines suivent la primo-injection. Le sang est collecté à la veine jugulaire une dizaine de jours après chaque injection d'immunisation. A la fin du protocole d'immunisation et de prélèvements, dont la durée sera inférieure à un an, les animaux sont réintroduits dans le troupeau caprin du domaine.

165- Ce projet est un projet pilote qui donnera lieu ou non à un projet de plus grande ampleur selon les résultats obtenus.

L'échographie est une technique non invasive pour visualiser les tissus, organes et flux sanguins in vivo. Une nouvelle technique d'échographie, l'élastographie, donne des résultats prometteurs dans des études chez l'humain pour déterminer la fermeté et la maturité du col de l'utérus chez la femme avant l'accouchement, permettant ainsi de mieux prendre en charge les femmes préparturientes. Cependant la relation entre les images obtenues et la structure exacte du col de l'utérus, en particulier son contenu en collagène, n'est pas connue. Nous envisageons de tester sur deux brebis proches du terme la relation entre les images du col et la structure du col de l'utérus. Elles seront examinées une première fois, puis, pour l'une des brebis, la maturation du col sera induite par injection intramusculaire de dexaméthasone 12-24 heures avant l'examen alors qu'elle ne sera pas induite chez la deuxième. Les animaux seront euthanasiés après examen et le col de l'utérus sera prélevé pour analyse. Nous mettrons aussi à profit l'abattage de chèvres dans le cadre d'un autre protocole déjà accepté pour effectuer une échographie de ces animaux le jour avant abattage et collecter les cols de l'utérus à l'abattage.

166- Nous avons caractérisé les épitopes reconnus par 4 anticorps spécifiques de diverses régions de la protéine d'enveloppe du VIH, gp41, bloquant l'infection de cellules en cultures par le VIH isolé de sujets en contact avec le VIH. Cette protéine constitue avec GP120 un dimère transmembranaire appelé GP160. Ce projet vis à vérifier si, par immunisation avec ces mimotopes, il est possible d'induire des anticorps identiques à ceux naturellement induits par le VIH chez l'homme. Pour cela, chaque séquence est exprimée par un phage recombinant. Un ensemble de 10 phages différents correspondant aux séquences définissant chaque mimotope servira d'immunogène pour chacun des mimotopes étudiés. Après une primo-immunisation intra musculaire avec l'ADN de la protéine entière gp41 suivie de 5 immunisations avec chaque combinaison de phages en boost, séparées entre elles par 15 jours. L'induction d'anticorps spécifique de gp41 puis des régions de gp41 spécifiques à chaque mimotope sera évaluée dans le sérum et les sécrétions vaginales et rectales des animaux. Dans un second temps, le laboratoire évaluera les fonctions antivirales de ces anticorps. Nous testerons ainsi 4 mimotopes individuellement et 1 combinaison des 4 mimotopes. Chaque condition sera évaluée sur 3 lapins. Un animal contact permettra d'éliminer l'hypothèse d'un passage des phages vaccinaux d'un animal à un autre dans nos conditions d'hébergement.

167- La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de l'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques généralement stables et difficilement destructibles (températures dépassant 1 000 OC). Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité, ...). Au

plan national, les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) impactent les sols agricoles dans les régions accidentellement ou historiquement contaminées (ex. St Cyprien, Grès en Bouère, Antilles françaises). Ces molécules ont été interdites en France depuis des décennies mais elles sont encore présentes dans les sols pour plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années (Plan National d'action sur les PCB, 2008, Cabidoche et al. 2008). La question qui se pose est celle du maintien de pratiques d'élevage sur les parcelles contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N° 1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre significatif de ruminants non conformes (exemple: crise PCB de St Cyprien en 2009, 8000 abattages de bovins; exemple: contamination Chlordécone aux Antilles, plusieurs dizaines de bovins non conformes en 2011-2012) et donc impropres à la consommation.

L'étude des modalités de contamination des animaux d'élevage par les polluants organiques et de leur décontamination à l'issue de l'exposition, constitue un enjeu réel pour la pérennité des systèmes d'élevage et pour la protection des consommateurs.

Dans le cadre de ce projet d'expérimentation animale deux entités scientifiques collaborent activement afin d'apporter des connaissances scientifiques directement utilisables par la profession. Il s'agit, d'une part, de l'Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux» (UR AFPA) de l'Université de Lorraine-INRA, qui dispose d'une expertise reconnue dans le domaine de la sécurité des aliments et plus particulièrement du transfert des contaminants organiques de l'environnement vers les produits animaux et, d'autre part, de l'Unité de recherches zootechniques (URZ) de l'INRA de Petit Bourg qui bénéficie d'une longue expérience des systèmes et des pratiques d'élevage aux Antilles. La synergie de ces compétences permettra, à terme, de proposer des pratiques d'élevage favorables à la sécurisation des produits.

168- L'hémophilie B est une maladie génétique héréditaire dans laquelle le gène codant pour le facteur de coagulation IX (fIX) est muté. L'absence de ce facteur essentiel entraîne des anomalies de coagulation sanguines (hémorragies prolongées et spontanées, y compris internes) et, en l'absence de traitement, une mort prématurée.

Des progrès significatifs ont récemment été faits dans le domaine de la thérapie génique pour le traitement de l'hémophilie B. Le gène codant pour le fIX est transféré in vivo grâce à un vecteur viral, permettant l'expression à long terme du fIX, avec une correction stable des épisodes hémorragiques. Cette efficacité thérapeutique vient d'être montrée chez le patient hémophile.

Cependant, une optimisation des vecteurs viraux et une meilleure compréhension des conséquences immunitaires du transfert de gène sont aujourd'hui nécessaires avant de pouvoir envisager de nouveaux essais cliniques et un traitement à grande échelle des patients.

L'amélioration du transfert de gène passera notamment par l'utilisation de doses moindres (et donc plus sécuritaires) de vecteur viral, tout en maintenant un niveau d'expression thérapeutique du gène d'intérêt

Un projet développé ces 2 dernières années nous a permis de démontrer l'efficacité d'un nouveau protocole de transfert du gène fIX dans le foie de primates non humains (macaques fascicularis), permettant d'obtenir un niveau d'expression supra physiologique de fIX après transfert de gène dans le foie, niveau jamais obtenu au préalable dans d'autres essais précliniques comparables. Cependant, ces animaux ont tous développés une réponse immunitaire contre cette protéine, avec le développement d'anticorps neutralisants anti-fIX humain. Or, une étude récemment publiée a montré que la mise en place d'un traitement immunosuppresseur transitoire à base de Rituximab et de Cyclosporine A permettrait de contrer les effets de cette réponse immunitaire et de rétablir l'expression de la protéine fIX chez les animaux. Notre objectif aujourd'hui est donc de tester si, dans le cadre de notre protocole de transfert de gène, ce traitement immunosuppresseur permet de rétablir une expression à long terme du fIX. Pour cela, une étude "pilote" sera réalisée chez un des macaques ayant au préalable subi un transfert du gène fIX et ayant développé cette réponse immunitaire. Cet animal recevra le traitement immunosuppresseur décrit ci-dessus, puis nous vérifierons si une expression de fIX peut-être à nouveau détectée. Nous nous limiterons à un seul animal pour cette étude de faisabilité.

Il n'existe pas aujourd'hui de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester l'effet d'un traitement de thérapie génique in vivo. Nous savons que l'efficacité du transfert de gène dans une lignée cellulaire in vitro n'est pas comparable à ce qui peut se passer in vivo dans l'organisme entier. D'autre part, le primate non humain a été choisi dans cette étude car c'est aujourd'hui l'espèce la plus pertinente pour développer des protocoles de transfert de gènes, avant leur translation chez l'Homme. En termes d'étude de la réponse immune notamment, de nombreux protocoles ont pu montrer que les modèles de rongeurs n'étaient pas adaptés puisqu'ils ne développent pas les systèmes de rejets immunitaires observés chez les gros animaux et chez l'Homme.

169- Nous avons montré, par de nombreuses expériences in vitro, qu'un composé de synthèse, le mannodendrimère Gc3Tri, est doué de propriétés anti-inflammatoires. Cet effet a été confirmé in vivo dans un modèle d'inflammation pulmonaire chez la souris, Il se traduit par un moindre influx des neutrophiles dans les poumons des animaux.

Nous proposons de tester l'effet de ce mannodendrimère dans un contexte infectieux et plus particulièrement dans le cas d'une infection à Mycobacterium tuberculosis. Cette bactérie est l'agent étiologique de la tuberculose responsable tous les ans de 1,5 millions de morts dans le monde. Lors d'une infection à M. tuberculosis on constate que l'accumulation de neutrophiles dans les tissus est un facteur aggravant de la maladie. Le but du protocole est donc d'évaluer l'impact de l'action anti-inflammatoire du Gc3Tri sur l'évolution de l'infection en association ou non avec une antibiothérapie. L'effet bénéfique supposé du mannodendrimère permettrait de diminuer la dose et/ou la durée du traitement des patients améliorant ainsi le pronostic d'évolution de la maladie et atténuerait les risques d'apparition de résistance aux antibiotiques des bactéries.

Il est nécessaire de tester l'effet du mannodendrimère dans un modèle animal cliniquement pertinent mimant les caractéristiques de la tuberculose humaine. Nous utiliserons une lignée de souris commercialement disponible, la lignée C3HeB/FeJ qui constitue un modèle de tuberculose humaine. Les études sont basées sur un nombre de 36 souris (6 groupes de 6 souris) par étude. Dans ce modèle expérimental comme dans la plupart des modèles d'investigation in vivo, la variabilité inter individuelle en réponse à un stimulus est importante et ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe en dessous de 6, ceci afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante., Sur deux ans le nombre de souris nécessaire sera de 420,

Nous envisageons de réaliser plusieurs tests simultanément afin de mutualiser les souris servant de témoins (témoins négatif et positif). L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité, ...), la physiologie (rythme respiratoire, température corporelle), le comportement alimentaire, ainsi que la prise de poids des animaux seront suivis quotidiennement. Ces différents critères permettront d'appréhender au mieux l'effet des produits testés et/ou la douleur que cette dernière pourrait engendrée. Tous signes et comportements anormaux et/ou perte de poids de plus de 20 % des animaux entraîneront l'exclusion de ces derniers qui seront ensuite euthanasiés si leur état est jugé irréversible.

L'utilisation d'antibiotique nous permettra de contrôler l'infection bactérienne et donc de réduire la douleur. Afin de démontrer l'effet bénéfique du mannodendrimère deux approches seront explorées. La première consistera à mesurer l'impact sur la durée du traitement antibiotique et la deuxième à réduire la dose d'antibiotiques. Cette procédure nous permettra de réduire la souffrance des animaux puisque dans tous les cas l'infection sera contrôlée afin de ne pas atteindre de point limite. Seuls trois lots de souris ne seront pas traités par les antibiotiques.

Les animaux de ces lots seront euthanasiés dès qu'un point limite sera atteint et leurs organes seront prélevés et un dénombrement bactérien sera réalisé, ne remettant pas en cause l'expérience.

170- La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui touche actuellement près d'un million de personnes en France. Dans cette maladie, qui se caractérise sur le plan neuropathologique par une dégénérescence neurofibrillaire, des dépôts de protéine β -amyloïde extracellulaires et des pertes neuronales, il semble exister aussi une composante inflammatoire qui participerait activement à la mort neuronale. Chez les patients Alzheimer, des symptômes dépressifs sont également associés (comorbidité) et ceux-ci pourraient être des symptômes précoces de cette maladie neurodégénérative.

Or, des données cliniques récentes montrent l'implication de processus neuroinflammatoires dans la dépression majeure chez l'homme et des travaux récents, chez l'animal, ont par ailleurs montré que certains antidépresseurs étaient capables de diminuer le dépôt de plaques amyloïdes. Notre hypothèse est que la neuroinflammation pourrait constituer un mécanisme commun à la dépression et à la maladie d'Alzheimer.

Le but de ce projet est d'étudier, à l'aide d'un modèle animal de maladie d'Alzheimer, l'effet de différentes molécules sur la neuroinflammation et leur conséquence sur la cinétique d'évolution des lésions neuropathologiques et des déficits cognitifs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Pour mener à bien cette étude, plusieurs techniques seront employées : études comportementales, imagerie cérébrale petit animal in vivo et analyses in vitro (biochimie, immunofluorescence).

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin transgénique de la maladie d'Alzheimer. Ce modèle de souris est décrit dans de nombreux travaux comme un très bon modèle pour cette pathologie, notamment pour ce qui est de la cinétique d'apparition des plaques amyloïdes.

Quatre groupes expérimentaux sont envisagés : un groupe soumis à un traitement antidépresseur, un groupe soumis à un traitement anti-inflammatoire non stéroïdien, un groupe contrôle et un groupe témoin (souris wild-type, non modifiées génétiquement). Chaque groupe sera composé de 20 animaux, amenant ainsi le nombre total de souris à 80 pour cette étude. Les animaux passeront des examens d'imagerie cérébrale nous permettant d'obtenir des données sans mise à mort de l'animal et de garder les animaux en vie pour d'autres tests. Parmi ces tests, nous étudierons le comportement des souris via l'utilisation de procédures comportementales non douloureuses. Suite à ces tests comportementaux les animaux seront destinés à l'exploration de données cellulaires (immunohistochimie) tandis que d'autres permettront d'obtenir des données de biochimie.

Ainsi, le protocole dans son ensemble nous permet d'utiliser un nombre restreint d'animaux tout en obtenant un grand nombre de données biologiques et comportementales et en gardant une puissance statistique importante pour chacun des tests.

171- Les cytokines sont des messagers moléculaires indispensables assurant la bonne communication entre les cellules du système immunitaire. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication d'une surproduction de cytokines dans les maladies inflammatoires chroniques, comme la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde. Depuis quinze ans, les premiers traitements ciblés anti-cytokines ont été commercialisés. Il existe actuellement 13 anticorps monoclonaux sur le marché qui ciblent les cytokines majeures, telles que le $TNF\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-6R ou l'IL-23, impliquées dans les maladies inflammatoires chroniques. Toutefois, ces traitements présentent plusieurs inconvénients tels que l'apparition d'effets secondaires, des coûts élevés (entre 10 à 15 k€/an/patient), mais surtout la non-réponse au traitement de certains patients et l'apparition de résistance. Un tiers des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, traités par des agents anti- $TNF\alpha$, sont non-répondeurs aux traitements et un tiers deviennent résistants suite à l'induction d'anticorps antitraitement. C'est pourquoi, il reste nécessaire d'élargir l'offre thérapeutique pour les maladies inflammatoires chroniques et de proposer de nouvelles stratégies d'inhibition des cytokines.

Notre projet a pour objectif de développer une stratégie alternative: l'immunisation active anti-cytokine. Celle-ci a pour but d'induire la production, par l'organisme même du patient, d'anticorps capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine produite en excès et donc d'en réduire ses effets délétères. Aujourd'hui, plusieurs équipes s'intéressent à cette méthode et les premiers essais cliniques utilisant des molécules entières de $TNF\alpha$ confirment à la fois l'innocuité et l'efficacité de cette stratégie.

Compte tenu des inconvénients possibles liés à l'utilisation de cytokine entière comme immunogène, notre laboratoire développe l'immunisation active à partir de fragments de cytokine, appelés peptides. Ces peptides étant à la base non immunogène car appartenant au "Soi", ils sont couplés à une protéine porteuse étrangère, la KLH (Keyhole Limpter Hemocyanin). L'immunogénicité de ce complexe, c'est-à-dire sa capacité à induire la production d'anticorps anti-peptide mais aussi anti-cytokine est évalué chez la souris.

L'effet protecteur des peptides couplés les plus immunogènes est ensuite évalué dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques, dans lesquels la cytokine ciblée est impliquée.

La première étape dans le processus de développement d'un médicament nécessite de démontrer l'efficacité du traitement dans un modèle animal mammifère proche de l'Homme, indispensable avant la transposition chez l'Homme. Cela permet notamment d'éliminer des traitements potentiellement toxiques. La souris est un modèle qui satisfait ses exigences. Les peptides sont choisis *in silico* et des tests *in vitro* sont effectués au préalable pour limiter le nombre d'animaux, mais, dans le cas de développement de médicaments, l'expérimentation animale est néanmoins nécessaire et n'a pas d'alternative.

Pour chaque cytokine ciblée, 10 peptides sont en moyenne synthétisés puis testés. Nous utilisons 6 souris par peptide plus un groupe contrôle de 6 souris commun à toute l'expérience soit 66 souris. Enfin pour la réalisation de modèles murins de maladies inflammatoires chroniques, le nombre de souris utilisés dépend du nombre de peptides couplés immunogènes identifiés, soit en moyenne d'après notre expérience, environ 2 à 3. Nous utilisons 10 souris par groupe plus 10 souris contrôles communes à toute l'expérience, soit 40 souris par modèle.

172- Le rejet des organes transplantés est aujourd'hui contrôlé par l'administration de traitements immunosuppresseurs aux patients. Cependant, ces traitements deviennent toxiques à long terme. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont alors nécessaires pour réduire la dose et la durée d'administration des traitements immunosuppresseurs. L'unité étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe. Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la transplantation d'organes, la morbidité et la mortalité restent beaucoup plus élevées dans la population de patients transplantés que dans la population générale. Ceci est principalement dû aux effets secondaires des immunosuppresseurs et au phénomène de rejet. Ainsi l'un des objectifs en transplantation est de comprendre les mécanismes du rejet et d'induire une tolérance spécifique du greffon qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur.

La transplantation est un processus dont la complexité ne permet pas une étude basée exclusivement sur des expériences réalisées *in vitro* et nécessite également des étapes avant le passage à l'Homme. Pour en étudier les mécanismes, nous devons donc faire appel à des modèles de greffes chez l'animal.

Un des modèles que nous avons mis au point dans notre unité est le modèle de greffe de peau chez la souris. Ce modèle présente de nombreux avantages, notamment la survie du greffon est facile à suivre. Par rapport à d'autres modèles, nous pouvons profiter d'un seul donneur pour greffer 3-4 receveurs. De plus, plus d'outils sont développés chez la souris en comparaison avec d'autres animaux, ce qui facilite le travail de recherche.

Ce modèle est également utilisé par d'autres équipes dans l'unité et a permis d'effectuer des travaux qui ont donné lieu à des publications.

173- Les lipides sont des constituants majeurs de l'alimentation humaine et leur consommation soulève actuellement des questions de santé publique, en effet ils sont très souvent incorporés dans les matrices alimentaires sous formes d'émulsions dont la stabilité physique est assurée par des molécules amphiphiles émulsifiantes tels que les tensioactifs (phospholipides, mono/di glycérides) ou des protéines (ex: caséines). A la vue de l'épidémie grandissante d'obésité et de l'utilisation massive des émulsions pour la formulation de produits alimentaires, il est primordial de se poser la question de l'influence de ces émulsifiants sur l'absorption, le métabolisme et le devenir des lipides et donc leur rôle potentiel dans l'épidémie d'obésité. A ce jour aucune donnée fiable ne fait consensus et le débat reste encore d'actualité. Les seules méthodes pouvant être utilisées sont des méthodes *in vivo* chez l'homme et/ou l'animal.

Dans cette étude, nous chercherons à évaluer l'impact des tensioactifs, sur la biodisponibilité des lipides alimentaires. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une thèse basée sur un plan d'expériences. Ce dernier se déroulera en 3 étapes qui contiendront des expérimentations classiques de mesures de biodisponibilité des lipides consistant à suivre les teneurs plasmatiques en lipides totaux, les profils lipidiques des chylomicrons, dosage des hormones circulantes liées à la digestion et le devenir des lipides pendant la période post prandiale (0h à 6h), *in vivo* sur une centaine de rats.

A l'heure actuelle et pour des raisons de physiologie intégrée, aucune autre méthode de substitution capable de donner les mêmes résultats n'est envisageable.

Ce plan d'expérience sera découpé en 3 étapes :

- la première visera à optimiser le nombre d'animaux grâce à l'acquisition de données préliminaires (témoins, amplitudes, encadrement des valeurs attendues, pertinence des résultats)

- la deuxième vise à chercher un effet via l'utilisation de l'émulsifiant soupçonné d'avoir le plus d'influence.

- la troisième permettra de comparer les effets de 3 émulsifiants supplémentaires.

Chacune de ces étapes conditionne la réalisation de la suivante et elles impliqueront de faibles niveaux de douleurs et de stress. Une surveillance régulière de l'état des animaux lors de ces expériences sera effectuée.

Pour chaque rat, seront réalisés un gavage unique puis des prélèvements de sang répétés. Le gavage est la seule méthode permettant de maîtriser la quantité d'émulsion ingérée par l'animal mais elle est peu traumatisante et l'émulsion est de qualité alimentaire. Les prélèvements de sang répétés s'effectueront au niveau de la veine caudale et sous anesthésie légère afin de ne

pas traumatiser l'animal. Les volumes de sangs totaux prélevés seront conforme aux exigences du respect de l'animal, soit 20 % maximum du volume sanguin total établi à partir du poids.

Les rats seront ensuite euthanasiés par le personnel de l'animalerie, les tissus d'intérêt seront prélevés pour être analysés.

Le nombre de 120 rats qui seront utilisés pour ce projet se justifie par un besoin de limiter la variabilité interindividuelle et par le nombre (3) de groupes / lot différents, nécessaires pour mettre en évidence et identifier l'origine de l'effet d'un émulsifiant. Chaque lot est constitué de 12 rats (au maximum). Et potentiellement 4 émulsifiants seront étudiés.

Dès que nous aborderons des aspects mécanistiques, des modèles in vitro, de cultures cellulaires seront utilisés pour limiter l'utilisation d'animaux.

174- DIG est un mélange d'extraits de 3 plantes connues pour leurs effets hépatoprotecteurs et proposé en médecine humaine comme médicament détoxifiant au niveau hépatique. Des études sur cultures cellulaires ont permis de démontrer que le mélange exerce aussi une activité antimutagène, qui protège les cellules des dommages génétiques induits pas les médicaments anticancéreux et les polluants tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les pesticides et les métaux. Le but de ce projet est de confirmer in vivo chez la souris cette activité antimutagène vis-à-vis d'un médicament anticancéreux (la mitomycine C) et d'un mélange génotoxique de 4 pesticides (glyphosate, atrazine, AMPA et déséthylatrazine). L'objectif final de cette étude serait ainsi d'étudier plus précisément l'activité biologique de ce principe actif pour mieux définir ses utilisations thérapeutiques.

175- La simulation chirurgicale répond à un impératif éthique : « jamais la première fois sur le patient »,

Cet apprentissage concerne des médecins en fin de formation ou des chirurgiens confirmés qui souhaitent acquérir d'autres techniques chirurgicales. L'apprentissage sur le modèle porcin est celui qui procure le plus de similitude avec la chirurgie chez l'homme. Cette simulation est indispensable avant de pratiquer soi même une intervention chirurgicale sur un patient.

176- Les principales macromolécules retrouvées dans la matrice extracellulaire (MEC) sont des polysaccharides ou glycosaminoglycanes (GAGs) qui peuvent se lier à un noyau protéique pour former des protéoglycanes. Certains polymères de glucose modifiés ont la capacité de mimer l'action de certains GAGs de la MEC, les héparanes sulfates, tout en étant résistants à la dégradation enzymatique. Ces polymères sont obtenus par synthèse chimique et peuvent optimiser le potentiel naturel des mammifères à régénérer les tissus, en remplaçant les sucres naturels détruits et en protégeant les signaux naturels nécessaires à la régénération tissulaire. Ces polymères mimétiques des héparanes sulfates de la matrice extracellulaire sont capables de les remplacer dans la matrice détruite afin de reconstruire l'échafaudage autour des cellules et de permettre aux signaux naturels de se repositionner dans l'espace comme dans le tissu d'origine.

D'un autre côté, le pronostic des patients opérés pour une tumeur maligne est étroitement lié au caractère exhaustif de la résection chirurgicale des lésions tumorales et des foyers métastatiques. Or, si les techniques per-opératoires actuelles de visualisation permettent de repérer les cellules tumorales grâce à leur forte capacité de multiplication ou grâce à des marqueurs de surface, aucune technique ne permet de visualiser la zone autour des tumeurs, ou matrice péri-tumorale, en cours de destruction.

Cette étude propose donc de visualiser la zone matricielle péri-tumorale à l'aide de HM (Heparan Mimetic) fluorescents (HM-Fluo) utilisables en per-opératoire et d'aider à l'acte chirurgical. Pour cela, les HM ont été couplés à différents fluorophores dérivés du vert d'indocyanine car le vert d'indocyanine est déjà utilisé en clinique humaine (angiographie, visualisation des ganglions sentinelles, quantification de la fonction hépatique...).

Concernant la stratégie d'expérimentation et afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, une expérience préliminaire sur 10 souris Swiss Nude mâles est prévue afin de définir le meilleur mode d'administration des composés et de mettre au point leur détection correcte. Pour la suite de l'expérience, un modèle simple de xénogreffe tumorale sera réalisé. 5 souris sont prévues par condition, 5 mimétiques sont à tester et 5 animaux contrôles sont également prévus soit 40 animaux au total.

Les résultats obtenus par cette approche permettraient ainsi de développer une technique de diagnostic (visualisation des cellules tumorales) avec une conséquence immédiate sur l'attitude thérapeutique (modification du geste du chirurgien) et éventuellement sur le schéma thérapeutique post-opératoire.

177- Au niveau mondial, plus de 112 millions de personnes souffrent de rétinopathie diabétique (source OMS). C'est la première cause de cécité et de malvoyance dans la population active (avant 60 ans).

Cette pathologie rétinienne ischémique est également potentiellement pourvoyeuse de phénomènes de néovascularisation rétinienne. Ces néovaisseaux sont associés à une fuite du réseau vasculaire rétinien responsable de l'œdème maculaire. L'ischémie rétinienne, par la dégénérescence cellulaire qui peut en résulter, est responsable de l'altération de la fonction visuelle. Dans la littérature il n'existe pas de modèles animaux reproduisant la totalité des anomalies retrouvées dans la rétinopathie diabétique (RD).

Le projet portera sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans l'angiogenèse oculaire anormale. Notre objectif est de mettre en place un modèle animal reproduisant de manière satisfaisante les anomalies rétiniennes observées chez l'homme.

Le complexe DAPs et les dystrophines sont impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière hématorétinienne (BHR) via la cellule gliale de Müller et les astrocytes. Ce complexe est localisé dans la partie périvasculaire de ces cellules.

Il a été rapporté dans la littérature que l'inactivation du gène codant pour une des protéines des dystrophines et du DAPs provoque la rupture de la BHR comme dans la RD. Cependant, aucune étude n'a été entreprise pour étudier le possible rôle de ce complexe protéique dans la rétinopathie diabétique.

Nous envisageons d'étudier le système vasculaire rétinien après invalidation du gène de la Dp71 (souris Ko Dp71), de la syntrophine (souris Ko syntrophine), de l'utrophine (souris Ko utrophine) et des dystrophines (souris mdx3cv) qui font parties des dystrophines et DAPs. En parallèle, nous allons rendre diabétique ces souris KO et des rats dans le but de reproduire de manières satisfaisantes les anomalies vasculaires rétinienne observés chez les patients atteints de rétinopathie diabétique (RD). Nous allons rendre diabétiques des rats dans le but d'étudier l'impact d'une hyperglycémie sur le complexe DAPs et la DP71. Le nombre total d'animaux nécessaire à cette étude sur 5 ans sera de 768 souris et 192 rats.

Ces modèles animaux permettront de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires liés l'invalidation de gènes codants des protéines dystrophines et du DAPs après induction du diabète.

Etant donnée la complexité du système vasculaire rétinien, il n'existe pas de méthodes alternatives disponibles et validées. Les animaux seront contrôlés quotidiennement par une personne compétente. Ces contrôles permettront de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, ou de retirer les animaux morts des salles d'hébergement. De plus, ces contrôles seront enregistrés. Les animaux auront à leurs dispositions des maisonnettes et des bâtons à ronger dans les cages. Les animaux dont la perte de poids et dépasse 15% du poids initial, seront sacrifiés.

178- En volailles de chair, l'alimentation protéique est essentiellement basée sur une incorporation de protéines végétales que l'on peut facilement réduire à une utilisation quasi-totale de tourteau de soja du Brésil, des États-Unis, ou de l'Argentine. On peut escompter réduire la proportion de soja par l'incorporation d'acides aminés libres potentiellement mieux utilisés au niveau digestif et métabolique qu'une protéine végétale native. Pour tester cette hypothèse, nous allons comparer chez le poulet de chair (*Gallus Gallus domesticus*) un aliment renfermant des protéines natives à 6 aliments renfermant des proportions croissantes d'acides aminés libres. 210 poulets de chair sont utilisés de J14 à J32, ils sont issus d'un croisement commercial (Ross) représentatif de la production (animal cible). Seuls des mâles sont utilisés, car ils possèdent un niveau d'ingestion et une croissance plus élevés, ils seront donc plus révélateurs des réponses métaboliques. En outre utiliser un seul sexe réduit la variabilité et donc le nombre d'animaux mis en place pour une même puissance statistique. Les poulets sont élevés en cages individuelles enrichies (contact olfactif, sonore, visuel et enrichissement mécanique) avec alimentation et abreuvement ad libitum. Les aliments sont équilibrés.

En fin d'essai, les poulets sont euthanasiés par électroanesthésie puis saignés conformément à la législation. Après l'euthanasie, différents prélèvements sont effectués: plumes, muscles, foie, ... puis ils sont broyés et lyophilisés avant d'être analysés.

Lors d'un essai précédent similaire, nous avons atteint une puissance statistique de 99% pour l'indice de consommation et de 88% pour le gain de poids, avec 30 poulets par lot. Notre recul sur la variabilité des analyses des nouveaux prélèvements est moindre, mais un effectif de 30 individus par lot doit permettre d'atteindre pour ces paramètres une puissance de l'ordre de 80% et de publier des résultats significatifs.

179- Le Plan National d'Actions Hamster 2012-2016 (action 3.2, « Suivre et améliorer les lâchers ») prévoit la poursuite des actions de recherche appliquée afin d'améliorer en continu l'efficacité des opérations de renforcement des populations de hamsters en Alsace.

De 2010 à 2012, de nouvelles méthodes de renforcement ont été expérimentées grâce au marquage et au suivi télémétrique de hamsters d'élevage. Il a été démontré que la mise en place de clôtures électriques et le maintien de blé non récolté améliore significativement les paramètres de survie (facteur 10) tout en permettant la reproduction in situ d'une part importante de femelles lâchées.

Une demande d'autorisation a été formulée au Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie (MEDDE) afin de poursuivre les opérations de mise en œuvre et d'évaluation des renforcements sur la période 2013-2017. Les efforts de recherche sont à centrer sur la phase d'installation des femelles d'élevage lâchées mais également, sur les conditions agro-environnementales (céréales non récoltées ou cultures productives alternatives) assurant la persistance des populations renforcées. Ce programme implique l'étude des paramètres démographiques (survie, reproduction), des animaux nés in situ, issus de la reproduction des individus relâchés.

Le marquage par émetteurs intra-abdominaux de 30 à 90 femelles sauvages en vue du suivi télémétrique est la méthode qui a été retenue pour ce programme d'études. Cela permettra d'estimer la survie des animaux. C'est également la seule méthode, qui, couplée aux pièges photographiques, permet d'obtenir des informations sur le nombre de portées par femelles (taux de reproduction), paramètre essentiel pour la dynamique des populations de l'espèce.

Enfin, le suivi in situ des individus marqués sur des parcelles dédiées à ces opérations ne devrait engendrer aucun dommage économique pour les agriculteurs concernés.

180- Le méningocoque (*Neisseria meningitidis*) est une bactérie commensale du rhinopharynx inféodée à l'homme. Dans certaines circonstances, cette bactérie peut être responsable de méningites qui surviennent lors d'une bactériémie consécutive au franchissement de la barrière épithéliale rhinopharyngée. Elle est ensuite capable de former des colonies à la surface de ces cellules et d'ouvrir les jonctions serrées inter-endothéliales et in fine de traverser la barrière endothéliale. Cette adhésion a également été mise en évidence au niveau de vaisseaux cutanés de patients atteints de purpura fulminans et de méningites à méningocoque, démontrant que l'adhésion de *N. meningitidis* n'est pas limitée aux vaisseaux cérébraux. Le purpura fulminans est l'une des grandes urgences de la pédiatrie et représente la forme la plus grave d'infection à Méningocoque. Son évolution est foudroyante. Il s'agit d'un choc septique caractérisé par la survenue d'une défaillance hémodynamique suraiguë associée à un purpura extensif du à une nécrose cutanée. L'effondrement de la tension artérielle conduit à une hypovascularisation des organes entraînant une défaillance multiviscérale qui amène au décès du patient. La dysfonction myocardique est un élément

central et caractéristique des sepsis graves à méningocoque, elle est responsable d'une défaillance hémodynamique précoce qui fait toute la gravité de la maladie. Une colonisation de l'endothélium myocardique par la bactérie est susceptible d'être la cause d'une dysfonction du myocarde responsable de la sévérité du choc septique observé si précocement au cours des purpuras fulminans méningococciques.

Le but de ce projet de recherche est d'explorer cette hypothèse. *Neisseria meningitidis* étant un agent pathogène strictement humain, l'étude de la physiopathologie de l'infection est actuellement limitée par l'absence de modèle expérimental animal qui permettrait de confirmer les données obtenues *in vitro* et tester d'éventuelles stratégies thérapeutiques innovantes. Nous avons mis au point un modèle de xénogreffe de tissu myocardique humain sur des souris SCID qui permet d'étudier la relation physiopathologique entre la bactérie pathogène et le tissu myocardique. Pour mener à bien ce projet nous avons prévu un nombre total de 70 animaux. Comme précisé plus haut, les infections à méningocoque sont strictement humaines et l'absence de modèle expérimental adéquat a été depuis toujours un frein à la compréhension de la physiopathologie des différentes étapes de l'infection à méningocoque *in vivo*, c'est-à-dire dans un milieu extérieur hostile (immunité innée, flux sanguin), beaucoup plus complexe qu'une monocouche de cellules endothéliales cultivées *in vitro*. La première étape consistera en la réalisation d'une greffe de tissu myocardique humain sur les souris SCID, la deuxième en une infection des modèles par voie intra péritonéale. La troisième étape consistera à l'explant des greffons et leur analyse en histologie et en immunohistochimie.

La grande nouveauté de ce modèle expérimental est qu'il permet une approche histologique et fonctionnelle de la cardiomyopathie septique humaine. Il va permettre de mieux comprendre les mécanismes microbiologiques et cellulaires responsables de la défaillance myocardique en permettant de se rapprocher pour la première fois de la fonction de l'organe. Il n'existe pas actuellement de méthodes substitutives qui pourraient remplacer les protocoles sur animaux vivants qui sont envisagés.

181- Les anticorps polyclonaux sont un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné.

Les anticorps polyclonaux de par leur très grande spécificité et affinité sont des outils très utiles pour identifier, caractériser, localiser ou doser des motifs constitutifs des biopolymères notamment (protéines, polysaccharidiques, composés phénoliques, ...). Dans le contexte des produits issus de l'agriculture, ces réactifs, quand ils existent, sont peu disponibles. De plus, certains procédés utilisés dans l'industrie agroalimentaire induisent dans certains cas des modifications dans ces biopolymères qui peuvent rendre inopérants les anticorps existants. La production d'anticorps adaptés aux produits issus de l'agriculture est donc toujours indispensable. Ces anticorps permettent par exemple d'identifier des souches bactériennes toxiques, de doser des allergènes. Plus généralement ces anticorps constituent des outils pour identifier des composés qui présentent un intérêt de recherche ou d'analyse pour les équipes demandeuses.

Un anticorps polyclonal s'obtient, comme pour une vaccination, en injectant l'antigène d'intérêt à des lapins par voie sous cutanée en présence d'adjuvant. La réponse immunitaire primaire après la première exposition à l'antigène est généralement de faible intensité. Pour augmenter la production d'anticorps, on procède à donc à d'autres injections (des rappels). On peut ainsi faire plusieurs rappels pour stimuler la production d'anticorps ou, le cas échéant, la réactiver. Les anticorps sont récupérés dans le sérum de l'animal après 2 ou 3 rappels. Pour cela l'animal est anesthésié et son sang prélevé par ponction intra cardiaque. Toujours sous anesthésie, l'animal est euthanasié par une injection létale de Pentobarbital.

La règle de 3R est appliquée tout au long de ces protocoles:

-Les prélèvements de sang intermédiaires sont limités à un faible volume afin de ne pas induire de souffrance de l'animal.

-Le dernier prélèvement est réalisé en présence d'analgésique en plus de l'anesthésique.

-L'environnement des animaux est enrichi pour améliorer leur bien-être.

Le plateau anticorps de l'unité BIA produit des anticorps polyclonaux pour plusieurs équipes de recherche du département CEPIA à l'INRA ou pour leurs partenaires dans le cadre de projet collaboratif. Un maximum de 40 lapins peut être immunisé chaque année soit 200 animaux sur une période de 5 ans.

Le protocole d'immunisation utilisé a été établi en suivant les recommandations émises par le

CCAC (Conseil Canadien de protection des animaux) : Lignes Directrices pour la production d'anticorps en 2002 (ISBN: 0-919087-38-8)

182- Au cours des 20 dernières années, la résistance aux antibiotiques a considérablement évolué alors que parallèlement la recherche de nouveaux antibiotiques s'est essouffée. L'émergence de bactéries dites toto-résistantes est devenu une préoccupation des pouvoirs publics. L'utilisation d'alternative aux antibiotiques devient aujourd'hui une priorité de santé publique. Une nouvelle formulation testée préalablement *in vitro* par un groupe pharmaceutique a fait l'objet d'une présentation au congrès de l'ICAAC en 2012. Les résultats ont été suffisamment convaincants pour développer un projet d'étude *in vivo* de ce produit pour ses propriétés intrinsèques antibactériennes et de synergie *in vitro* avec les antibiotiques. L'utilisation des modèles animaux dans le cadre des anti-infectieux est un passage indispensable de la phase préclinique d'évaluation. Les tests *in vitro* ont été validés (étude des CM1 d'une population bactérienne, étude de la cinétique de bactéricidie, ...). Ce projet sera réalisé dans le cadre d'un modèle expérimental de pneumopathie murine à *Acinetobacter baumannii* souche SAN, validé et publié antérieurement pour les essais thérapeutiques. Il s'agit d'un modèle aigu compartimentalisé de pneumonie qui garantit l'efficacité clinique des produits testés et donne des informations sur la pharmacocinétique sanguine et pulmonaire des produits testés. La justification du modèle de pneumonie est liée à l'importance de cette pathologie en milieu hospitalier particulièrement avec des bactéries résistantes aux antibiotiques. Le choix de la souche d'*Acinetobacter* est en lien avec cette multirésistance et le tropisme pulmonaire. S'agissant d'une pathologie infectieuse aiguë, il y a une mortalité importante. Comme

dans le cadre des pathologies infectieuses, ces animaux survivants ne peuvent resservir à d'autres expérimentations en raison du développement de défenses immunitaires au cours de cette maladie.

Nous utilisons 15 souris par groupe thérapeutique pour l'étude clinique et 15 souris pour l'étude microbiologique et pharmacocinétique soit 180 animaux au total, ce nombre correspondant aux règles préalablement établies des 3R.

Les marqueurs d'efficacité relevés dans ce modèle seront:

- taux de survie
- poids
- état clinique
- compte bactérien pulmonaire (poumon, rate et sang)
- Pharmacocinétique.

183- Nous étudions différentes situations dans lesquelles l'homéostasie du muscle adulte est perturbée comme la régénération, l'hypertrophie et l'atrophie musculaire. Nous nous intéressons au destin cellulaire des cellules souches musculaires adultes suite à ces perturbations ainsi qu'à l'adaptation des fibres musculaires. Nous cherchons à comprendre le rôle du facteur de transcription Srf dans ces adaptations du muscle squelettique adulte. Pour cela nous avons générés des modèles murins chez lesquels il est possible d'invalider le gène Srf de manière conditionnelle et inductible dans deux compartiments cellulaires du muscle squelettique : les fibres musculaires et les cellules souches musculaires adultes (les cellules satellites). La plupart des analyses ne peuvent pas être reproduites in vitro ni ex vivo, ce qui nécessite l'utilisation des modèles murins adultes que nous avons mis en place. L'analyse phénotypique des muscles de ces souris à l'état basal ou dans des conditions où leur homéostasie a été perturbée (atrophie, hypertrophie et régénération) nous permettra de mieux comprendre la fonction de Srf dans le muscle. En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules musculaires seront utilisées pour disséquer les mécanismes moléculaires sous jacents.

Cinq cent soixante souris sont nécessaires pour mener à bien nos projets et permettre l'analyse statistique des différences observées. Nous allons réaliser 4 différents protocoles chez l'adulte nécessitant de 96 à 192 animaux par procédure. Pour chaque protocole nous allons comparer des animaux de différents génotypes à différents temps.

Les souris sont anesthésiées par injection du mélange Kétamine/Xylazine. De la Buprenorphine est administrée au moment de l'anesthésie afin de renforcer l'analgésie (durée d'action de 8 à 12h permettant de gérer la douleur pendant l'intervention et en post-opératoire). Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur. Nous avons défini les variables analysées et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique (Buprenorphine) ou seront euthanasiés.

184- Le rein a pour rôle principal d'excréter les substances non utiles à l'organisme qui sont ingérées ou produites par le métabolisme. Il participe ainsi au maintien de l'homéostasie du milieu intérieur de l'organisme. Pour assurer cette fonction, le rein est capable d'adapter ses fonctions de transport en réponse aux variations environnementales, en particulier aux variations des apports alimentaires. Cette capacité d'adaptation résulte de plusieurs mécanismes en fonction de l'intensité/la durée des variations de l'environnement : a) activation de systèmes préexistants, b) synthèse de nouveaux transporteurs, et c) augmentation du nombre de cellules responsables de la fonction concernée. Le présent projet vise à étudier les modalités de ce dernier mécanisme de prolifération cellulaire, et son impact sur l'homéostasie.

Le projet est focalisé sur la prolifération des cellules du tubule collecteur rénal qui sont le siège de l'excrétion d'acide et, le cas échéant, de la réabsorption de potassium, et sont ainsi responsables du contrôle final de l'excrétion de la charge acide et du potassium et du maintien de l'homéostasie acido-basique et potassium.

Notre étude portera principalement sur la réponse adaptative à une charge acide alimentaire, et les résultats principaux seront confirmés/infirmez dans la réponse à une carence alimentaire en potassium.

La réalisation du projet nécessitera l'utilisation, dans le respect de l'éthique, de 527 souris. Ce nombre, qui prend en compte les exigences de remplacement et de réduction, est incompressible car seul les modèles animaux peuvent répondre à nos questions.

185- La métabolomique a rencontré un succès croissant, grâce à l'amélioration des outils analytiques et statistiques et à l'approche globale de ces méthodes, qui exige une connaissance minimale des métabolites cibles. La plupart des études métabolomiques se sont concentrées sur les variations métaboliques résultant de réponses environnementales ou à des stress avec peu de matériaux (généralement un seul type d'échantillon comme urine, sang ou organes...). La découverte de marqueurs est par conséquent effectuée à partir d'un échantillon restreint de métabolites détectés, qui reflètent mal le métabolisme global. Cependant, des généralisations systématiques ont été réalisées à partir de ces biomarqueurs potentiels observés de façon partielle. Le présent projet vise à améliorer la signification des bio-marqueurs potentiels choisis par métabolomique, et à simplifier l'interprétation métabolique de la réponse observée. Ce résultat sera obtenu en tenant compte au mieux des aspects analytiques et des échantillons. Le projet sera mené chez des souris dont le tube digestif héberge différents types de flores bactériennes et qui seront nourries avec différents types d'aliment. Les analyses seront réalisées d'abord sur les tissus, qui fournissent une description localisée des variations métaboliques, et sur les biofluides, pour une analyse plus générale et systémique. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail qui se propose d'analyser les variations métaboliques globales dans les tissus et les biofluides de l'organisme en réponse à des conditions digestives variées (variations de flore intestinale, variations de régime alimentaire). Le nombre de souris nécessaire (92) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

186- Il est maintenant démontré que des cellules progénitrices, dites « souches », se maintiennent dans le cerveau adulte des vertébrés. Elles sont organisées en zones germinatives locales, capables de générer de nouveaux neurones dans le cerveau mature. Le maintien contrôlé du nombre et de l'activité de ces cellules souches est d'importance fondamentale pour la physiologie cérébrale: ainsi, une déplétion des zones germinatives chez l'homme et le rongeur corrèle avec des troubles de l'humeur (dépression, sensibilité aux drogues de dépendance) et avec les troubles de la mémoire associés au vieillissement alors que la transformation et l'amplification des populations souches pourraient être à l'origine de tumeurs cérébrales. Les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le maintien des populations de cellules souches neurales dans le cerveau adulte restent mal connus. Le but de ce projet est d'analyser la fonction dans ce processus de la voie de signalisation Notch et de son réseau génique, impliquant notamment les gènes « enhancer-of-split » et le microARN-9. Notre modèle expérimental est *Danio rerio* (zebrafish), chez qui, au contraire des mammifères, une large population de cellules souches neurales est maintenue dans le cerveau adulte. Par ailleurs, ces cellules sont de localisation superficielle (au contraire des mammifères où elles sont profondes), permettant une imagerie en temps réel non invasive sur animal vivant. L'avantage majeur d'un tel modèle sera donc de pouvoir combiner une analyse du comportement des cellules souches in vivo dans leur environnement intact chez un vertébré, et ce sans nécessiter d'approches expérimentales invasives.

Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet est de 244. Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes:

Remplacement: Le travail sur cellules souches en culture a clairement révélé des comportements cellulaires aberrants jamais observés in vivo, notamment concernant le mode et la fréquence de division. Ces deux paramètres impactent de façon directe le maintien, la déplétion ou l'amplification des populations souches du cerveau. Par ailleurs, l'un de nos buts spécifiques est de comprendre les interactions cellulaires existant entre les cellules souches et leur environnement. Notre projet nécessite donc une approche in vivo sur l'animal.

Réduction: Toutes nos analyses sur tissu reposent sur des mesures quantitatives obtenues par comptage direct des cellules souches sur coupes. Ainsi, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Par ailleurs, le cerveau adulte de *Danio rerio*, à la différence des modèles « classiques » mammifères, maintient un grand nombre de cellules souches neurales. Utiliser cette espèce permet donc d'avoir accès à un beaucoup plus grand nombre de cellules souches par animal, diminuant d'autant le nombre d'animaux à utiliser.

Raffinement: nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux chez qui nous n'attendons aucune souffrance particulière. Les autres manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie.

187- Cette étude d'intervention nutritionnelle sur un modèle murin d'obésité induite par l'alimentation a pour objectif de rechercher l'impact d'une supplémentation du régime avec un extrait de Bois de gaulette (*Doratoxylon apetalum*), riche en polyphénols, sur les effets délétères associés à un tel régime. Il s'agira en particulier d'évaluer l'impact de la supplémentation sur le stress oxydant, l'inflammation et l'insulinorésistance.

Le rationnel de cette intervention s'appuie sur les résultats d'études préliminaires réalisées in vitro sur un modèle de cellules adipocytaires qui décrivent des effets positifs de l'extrait de *D. apetalum* sur ces différentes cibles cellulaires. D'autre part, le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, dans la mesure où il est établi que les formes sous lesquelles les polyphénols circulent dans l'organisme sont différentes des formes natives présentes dans les sources végétales, les effets biologiques de l'extrait de *D. apetalum* jusque là décrits sur modèles cellulaires doivent maintenant être démontrés in vivo, dans des conditions d'exposition qui intègrent la biodisponibilité et le métabolisme des polyphénols. C'est pourquoi, le présent projet prévoit la mise en place d'une étude d'intervention nutritionnelle chez l'animal afin de caractériser les effets biologiques potentiels de l'extrait dans un contexte nutritionnel et physiologique. Cette étude sera réalisée sur souris, modèle animal pour lequel des régimes obésogènes ont été décrits dans la littérature pour induire spécifiquement une obésité accompagnée d'une résistance à l'insuline. Le nombre d'animaux mis en expérimentation (n=30) a été calculé pour assurer à l'étude une puissance statistique suffisante. Afin de disposer de tout le matériel biologique pour caractériser les effets et les mécanismes d'action des polyphénols, tous les fluides et tissus d'intérêt nécessaires seront prélevés en fin d'expérimentation. D'autre part, même si la procédure expérimentale est une intervention nutritionnelle qui ne devrait occasionner que peu de douleur, afin de veiller au confort des animaux rendus obèses ces derniers seront observés quotidiennement et des mesures de confort seront prises pour optimiser leurs conditions d'hébergement. In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de cette plante médicinale originaire de l'Océan Indien dans la prévention nutritionnelle de l'obésité et des dysfonctionnements associés qui jouent un rôle clé dans la survenue du diabète et des maladies cardiovasculaires.

188- Les objectifs de notre projet sont de valider avec nos protocoles expérimentaux un modèle endogène de dépression, les rats Wistar Kyoto (WKY), et de vérifier l'efficacité antidépressive de notre molécule MAP4343 sur cette souche. L'effet antidépresseur de MAP4343 chez le rat de la souche Sprague-Dawley (SD) a précédemment été démontré avec un modèle de dépression basé sur un stress chronique de type isolement social. Le modèle de dépression Wistar Kyoto a très bien été décrit dans la littérature et cette souche de rat est naturellement prédisposée à un comportement de type « depressive-like » et anxieux. Les avantages d'utiliser cette souche comme modèle de dépression est que les animaux n'ont pas besoin d'être soumis à un protocole de stress pour induire des altérations comportementales. Cela évite également la variabilité de réponse subjective à un modèle chronique de stress qui est présent chez d'autres souches de rat. Tout ceci permet d'être en conformité

avec les exigences de réduction et de raffinement. En effet, la souffrance et le nombre d'animaux est réduit en comparaison au modèle basé sur un stress chronique.

Les rats WKY seront comparés aux rats des souches SD et Wistar (WI) dans des tests comportementaux, avec ou sans traitements de notre molécule MAP4343. De plus, les effets de MAP4343 seront comparés à un antidépresseur conventionnel comme la fluoxétine ; le premier injecté en sous-cutané, le deuxième injecté en intrapéritonéale. Les injections seront réalisées une fois par jour sur une durée maximale de 11 jours. Les tests comportementaux envisagés ont déjà été validés dans la littérature pour analyser l'état de type dépressif, la mémoire et l'anxiété. Quotidiennement, les rats sont observés et pesés pour vérifier leur bien-être général.

Nous avons prévu d'utiliser 30 rats pour les souches SD et WI et 62 rats WKY soit un total de 122 animaux pour l'ensemble du projet.

189- Le diabète de type II, qui représente 90% des cas de diabète, survient plus tard dans la vie que le diabète de type 1 qui atteint des personnes jeunes et apparaît souvent dans l'enfance. Le diabète de type II est principalement dû à un état de résistance à l'insuline et est associé au surpoids.

Le nombre de personnes atteintes de diabète de type II est en progression constante et on attribue cette tendance au mode de vie "occidental" qui est associé à la sédentarité et à l'obésité, ainsi qu'au vieillissement de la population.

Le diabète de type II se manifeste généralement après l'âge de 40 ans, mais atteint aujourd'hui de plus en plus d'enfants et d'adolescents, en raison de l'obésité qui touche de plus en plus de jeunes.

Cette étude de validation est réalisée afin de valider les conditions expérimentales optimales d'un projet permettant de mimer un diabète de type II et son apparition progressive chez l'homme. Pour cela, l'administration d'un régime gras pendant 4 semaines suivie de l'administration répétée de Streptozotocine (détruisant les cellules B du pancréas, productrices d'insuline) doit nous permettre d'atteindre notre objectif. Ce protocole a été prévu après lecture de nombreuses références bibliographiques dans ce domaine et après réalisation d'une première étude de développement de ce modèle.

Le régime gras induit une obésité, une hyperlipémie, une hyperglycémie contrôlée par une hyperinsulinémie puis réduit la tolérance au glucose (entraînant ainsi une résistance à l'insuline). La streptozotocine, par libération d'oxyde nitrique, induit la mort des cellules β pancréatiques, supprimant ainsi la production d'insuline. Les animaux qui reçoivent le régime gras présentent une hyperglycémie stable dans le temps. Ce modèle devrait également permettre d'augmenter les triglycérides et le cholestérol plasmatiques. Ce modèle mimerait donc le diabète de type II chez l'homme en reproduisant les différentes étapes, de la résistance à l'insuline à la destruction des cellules β sans oublier l'augmentation de la lipémie: de nombreux aspects du syndrome métabolique se retrouvent dans ce modèle. Notre objectif est également d'évaluer les effets néfastes du diabète de type II sur le comportement, notamment l'apprentissage tel qu'il est observé chez l'homme.

Compte-tenu du nombre de personnes atteintes de diabète de type II dans la population totale des personnes diabétiques et de sa constante augmentation, ce modèle présente un enjeu socio-économique certain. Notre objectif, après validation de ce modèle, est de l'utiliser, d'une part, pour tester l'efficacité de nouvelles molécules pharmacologiques et, d'autre part, pour prouver l'efficacité de produits naturels issus de l'industrie agroalimentaire.

Ce projet fait suite à une première étude qui a permis de valider l'efficacité du régime gras par rapport à un groupe témoin ainsi que d'évaluer le nombre d'animaux par groupe nécessaire et suffisant. Ainsi pour raffiner au maximum l'utilisation des animaux, 3 groupes de 6 rats seront utilisés et il n'y aura pas de groupe régime témoin pour cette étape de validation.

190- L'HSA: Epidémiologie

○ Les hémorragies sous arachnoïdiennes (HSA) d'origine anévrysmale représentent 5% des Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC). Il s'agit d'une pathologie grave puisque 40% de ces patients décèdent dans le mois suivant leur admission à l'hôpital. Seulement une petite minorité des patients ayant présenté une HSA ont réellement une récupération complète sans séquelles et 20% d'entre eux seulement n'ont pas de diminution de leur qualité de vie. A ce titre, l'HSA est un enjeu de santé publique et l'objet d'une recherche active.

Les complications

○ Deux complications principales grèvent le pronostic des patients ayant présenté une HSA :

• le ressaignement

• Le vasospasme, plus tardif, qui correspond à une vasoconstriction pouvant rester asymptomatique ou au contraire induire une ischémie cérébrale gravissime. Pourtant, le vasospasme retrouvée à l'angiographie n'est pas parfaitement corrélé à la morbidité de l'HSA, faisant suspecter des mécanismes plus complexes, récemment regroupés sous le terme « de lésions cérébrales précoces » (EBI). Ces lésions sont supposées à l'origine des lésions ischémiques retrouvées à distance, même sans la mise en évidence d'un vasospasme, il s'agit d'ischémie cérébrale différée (DCI).

• La physiopathologie

○ La physiopathologie du vasospasme avec ou sans DCI reste obscure malgré de très nombreuses études. Les recherches se tournent donc vers le DCI tant sur le versant physiopathologiques, que thérapeutiques. Comme le montre la figure 1, les « lésions cérébrales précoces » (EBI), préalables au DCI, sont secondaires à de nombreux mécanismes qu'ils soient physiologiques (baisse du CBF, augmentation Tension ...), ioniques, biochimiques ou moléculaires

○ Une étude récente a montré que, dans un modèle d'HSA chez le rat, il existe une activation microgliale à proximité mais aussi à distance des espaces sous arachnoïdiens. La détection de cette activation microgliale pourrait permettre de diagnostiquer précocement l'EBI, de déterminer les patients à risque de DCI, d'adapter leur prise en charge, voire de juger de l'efficacité des traitements.

- Exploration de la neuroinflammation

- Il n'était, jusqu'à récemment, pas possible d'explorer cette neuroinflammation autrement que sur coupes histologiques. La protéine translocatrice (TSPO), anciennement nommée « récepteur aux benzodiazépines de type périphérique », est une protéine localisée dans la mitochondrie des cellules gliales et qui ne s'exprime que très peu dans le cerveau normal. En réponse à une «agression» cérébrale, la microglie passe de la forme quiescente à la forme activée dont l'une des caractéristiques est de sur-exprimer la TSPO. La TSPO est donc une cible particulièrement pertinente afin d'évaluer cette neuroinflammation et notamment au cours de l'HSA.

- L'exploration par imagerie moléculaire scintigraphique TEP ou TEMP de la TSPO requiert l'utilisation de radiotraceurs spécifiques tel que le ¹⁸F DPA-714, déjà utilisé chez le petit animal pour l'exploration de la neuroinflammation.

- Notre hypothèse est que l'exploration en TEP de la neuroinflammation chez des rats ayant subi une HSA permettra de proposer des sous-groupes à risque de Del. Sur cette base, nous proposons dans une première étape de valider cette hypothèse dans un modèle animal d'HSA chez le rongeur.

- Protocole expérimental

- Nous réaliserons donc une chirurgie première dans un modèle d'HSA déjà validé dans la littérature internationale: le modèle du filament. Cette procédure sera réalisée sur 20 rats (10 rats HSA et 10 rats SHAM). L'étude nécessite cependant une demande pour 30 rats au regard de la mortalité relativement élevée de la procédure rapportée dans la littérature. Secondairement (J2 post-opératoire), les rats bénéficieront d'un TEP-TDM après injection d'un radiotraceur spécifique de la neuroinflammation. Immédiatement après, les rats seront sacrifiés et les cerveaux prélevés pour analyse autoradiographique.

- Raffine: l'ensemble de la procédure expérimentale se fait sous antalgique. Le milieu d'hébergement des rats est enrichi et les rats sont surveillés pluri-quotidiennement à la recherche de signe de souffrance.

- Remplace: Il n'existe aucun modèle mathématique, ni de simulation de la pathologie anévrysmale. Le modèle murin est le plus utilisé dans la littérature. L'utilisation d'animaux pour l'étude in-vivo de la pathologie est indispensable

- Réduire: Le protocole chirurgical utilisé tendra à réduire au maximum les risques hémorragiques et de décès précoces afin de se limiter aux 20 rats (10 HSA et 10 SHAM) nécessaires du point de vue statistique.

191- Ce projet a pour but d'évaluer une potentielle action pro-cognitive d'une nouvelle molécule candidat-médicament chez le rongeur (rat ou souris) par réversion d'un déficit mnésique induit par la scopolamine et testé dans un test d'alternance spontanée.

Au cours de chaque étude de ce projet, les animaux (12 par groupe) sont traités préventivement avec le candidat-médicament à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (total de 5 groupes; soit un nombre prévisionnel maximum de 7200 animaux sur 5 ans) et reçoivent une administration de scopolamine. Ils sont ensuite placés dans un labyrinthe en forme de Y dans lequel ils évoluent librement pendant 5 minutes. Pendant la durée du test, la séquence des entrées dans chacun des bras du labyrinthe est comptabilisée.

Le rongeur a une tendance naturelle à alterner, c'est-à-dire à se rappeler de l'environnement déjà exploré (bras déjà visité) pour explorer un environnement nouveau (bras non visité). C'est cette capacité pour le rongeur de mémorisation de son environnement qui est utilisée ici comme index de mémoire à court terme.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé sur le rongeur (rat ou souris) car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la mémoire. A ce jour, le rongeur (rat ou souris) est l'espèce la plus adaptée pour ce type d'évaluation des processus mnésiques et l'alternance spontanée est un test simple et rapide fréquemment utilisé pour tester les effets pro-cognitifs de composés pharmacologiques. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R: remplacement, réduction et raffinement).

192- L'obésité est tout à la fois une pathologie invalidante et un facteur de risque pour d'autres affections potentiellement mortelles. Il n'existe pas de solution thérapeutique simple pour la vaincre de façon durable. L'intervention chirurgicale la plus efficace est irréversible et complexe. Nous avons mis au point une solution plus simple, potentiellement réversible visant à combattre l'obésité morbide. Cependant cette nouvelle approche thérapeutique nécessite d'être améliorée et validée avant la transposition à l'homme. En effet, notre stratégie consiste à stimuler tout au long de la journée les troncs vagues abdominaux. Cette stratégie présuppose la pose chirurgicale de façon minimalement invasive d'électrodes en aval du diaphragme ainsi que la pose d'un neurostimulateur évolué. Nous maîtrisons maintenant ces solutions ainsi que la pose chirurgicale des appareils. L'objectif de notre étude est donc de montrer que le nouveau neurostimulateur couplé avec nos nouvelles électrodes implantées par voie coelioscopique induit bien une réduction pondérale chez des miniporcs rendus spontanément obèses par l'ingestion d'un régime de type européen. Pour cela nous aurons besoin de 22 miniporcs obèses (16 plus 6 pour les aléas chirurgicaux), répartis dans 2 groupes de 8, un groupe témoin et un groupe avec une VNS. Le comportement alimentaire des animaux sera suivi sur 6 mois. Tout au long de cette période, l'état d'obésité des animaux sera caractérisé en mesurant d'une part la répartition des graisses par CT scan et d'autre part, la taille des adipocytes.

193- Le but de ce projet est de tester des inhibiteurs des NADPH oxydases qui sont des enzymes responsables du stress oxydatif dans un modèle murin de stéatose hépatique non liée à l'alcool (NASH). NASH est une pathologie hépatique multifactorielle qui est la conséquence notamment d'un diabète et d'un syndrome métabolique souvent lié à un surpoids ou à une dyslipidémie. Beaucoup de patients présentent également une hypertension artérielle.

Le modèle de NASH que nous souhaitons développer chez la souris mâle C57Bl/6 se présente comme un des modèles les plus relevant de la pathologie et il se présente comme étant la combinaison d'un diabète induit à la Streptozotocine et d'un syndrome métabolique induit grâce à une diète hyperlipidique (High Fat Diet). Il s'agit ainsi de recevoir des femelles gestantes et d'induire un diabète de type 1 à l'aide d'une injection de STZ en sc. au jour 2 de vie. Les bébés mâles et femelles seront ainsi injectés pour ne pas perturber la nichée et risquer un problème de rejet de la mère ou de cannibalisme. Les gants seront aussi changés entre chaque cage. Les animaux sont donc laissés en cage par portée et auront à leur disposition des plaques de ouate pour constituer leur nid ainsi que des maisonnettes rouges pour leur permettre de se cacher et ils auront à leur disposition de l'eau et de la nourriture en forme de croquette à volonté. Au bout de 4 semaines les femelles (mères et filles) sont ainsi enlevées des cages et euthanasiées puis les souris mâles sont placées sous diète enrichies en lipides type High Fat Diet (HDF) pour six semaines supplémentaires. Le traitement avec les molécules de Genkyotex aura lieu de la semaine 6 à la semaine 10.

Ces souris vont donc présenter une pathologie évolutive qui passe par les mêmes stades d'évolution que chez l'homme à savoir une inflammation hépatique, le développement d'une stéatose associée à de la fibrose, le développement d'une fibrose hépatique massive puis sur des stades avancés le développement de nodules puis de carcinomes.

Dans notre cas nous souhaitons nous concentrer sur le développement de la stéatose (NASH) qui met 10 semaines à se développer.

Ainsi les souris vont présenter des enzymes hépatiques élevées, une augmentation des Triglycérides et du cholestérol, une hypertrophie du foie, une diffusion de gras dans les tissus hépatiques (stéatose) ainsi que le développement d'une fibrose hépatique ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation des lipides dans le foie.

L'ensemble de ces données collectées et analysées tout au long de l'expérience seront ainsi cliniquement transposables et permettront de prouver la valeur réelle des molécules testées. Les souris dans ce modèle de NASH présentent donc exactement les mêmes symptômes que les patients. Nous regarderons donc l'effet de nos inhibiteurs sur l'ensemble de ces paramètres qui devraient être atténués de manière dose dépendante.

Dans chaque expérience nous testerons 6 conditions différentes et nous incluons 8 animaux par condition soit un total de 288 souris mâles.

Malheureusement, aujourd'hui aucun modèle in vitro ou ex-vivo n'existe pour mimer suffisamment toutes les composantes de la fibrose hépatique à savoir à la fois la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes et le stress oxydant. Ces modèles ne peuvent pas non plus de façon satisfaisante prédire le comportement biologique in vivo d'un composé ou l'impact physiologique et l'efficacité d'un traitement donné. Cependant nous veillerons à ne tester que les molécules les plus avancées et les plus optimisées qui auront déjà démontrées des activités in-vitro performantes, une absence de toxicité cellulaire et des propriétés pharmacocinétiques permettant d'envisager raisonnablement une efficacité in-vivo. Il est prévu de tester 6 molécules sur un espace de deux années.

De plus, ce nombre de 8 animaux par groupe nous apportera le meilleur compromis entre le fait de ne pas trop utiliser d'animaux par groupe et le fait de générer des résultats avec une très bonne puissance statistique. Le test statistique qui sera utilisé sera le test de comparaison multiple de Bonferroni. Le but de cette étude sera de démontrer:

- l'effet de notre composé par rapport aux différents groupes contrôles
- l'effet de notre composé par rapport à la molécule de référence le Telmisartan
- un effet pharmacologique de notre composé, proportionnel aux doses administrées

Le test de Bonferroni est donc le test le plus adapté pour comparer différents groupes et différentes conditions entre eux et démontrer une significativité sur des échantillons de petite taille (8 à 10 individus par groupe). Une p value de <0.05 sera considérée comme significative

Enfin ce modèle est un modèle robuste et reproductible et qui est très représentatif des cas cliniques chez l'homme. Les résultats générés permettront ainsi d'envisager sereinement une transposition de l'activité attendue chez l'homme.

Même si les animaux ne présentent pas de contraintes particulières, les souris subissent un léger retard de croissance du au diabète de type 1 ainsi qu'à l'augmentation de leur diurèse. Nous serons donc tout particulièrement vigilent au suivi clinique quotidien ainsi qu'au suivi hebdomadaire du poids corporel des animaux tout au long de l'expérience. Ainsi tout animal qui présente des signes de prostration, ou qui aura perdu 10% de poids corporel entre deux pesées sera exclu de l'expérience et sera donc euthanasié.

194- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client de la société demandeuse, qui développe notamment des composés thérapeutiques dans le domaine du diabète. Le principal objectif de l'étude est d'évaluer les effets d'un traitement aigu par un composé X (la dénomination du composé est sujette à confidentialité) sur le métabolisme énergétique chez un modèle murin de diabète de type II et de comparer ces effets à ceux d'un composé de référence. En parallèle, un groupe d'animaux supplémentaire sera utilisé afin d'obtenir un corrélat pharmacocinétique à l'étude pharmacodynamique. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de détailler les mécanismes d'action de leur composé antidiabétique.

Concernant l'étude de pharmacodynamie, les animaux seront placés dans des cages intelligentes (Physiocages, couplées au système Oxylet, Panlab) pour une période de 72h pendant laquelle les consommations alimentaire et hydrique, l'activité locomotrice et les échanges respiratoires seront mesurés à haute fréquence de manière continue et automatisée. La phase d'enregistrement de 72h en physiocages se divisera en une première phase d'habituation de 24 heures, suivant laquelle les animaux recevront un traitement aigu (composé X à 2 doses, metformine ou véhicule), immédiatement suivi d'une nouvelle phase de 48h de mesure des paramètres cités ci-dessus (phase expérimentale proprement dite). Cette étude

pharmacodynamique est basée sur des procédures expérimentales non invasives (le traitement est pratiqué par voie orale par un expérimentateur expérimenté) et le niveau de souffrance qui en résulte est par conséquent léger voir nul.

En ce qui concerne l'étude pharmacocinétique, le traitement aigu (composé X à 2 doses) sera également pratiqué par voie orale et les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie par ponction cardiaque en tant que procédure terminale avant euthanasie des animaux.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de comportements tels que la consommation alimentaire, la prise hydrique, les dépenses énergétiques et l'activité locomotrice.

Le modèle animal envisagé est un modèle de souris diabétique et obèse (db/db) qui est particulièrement bien documenté dans la littérature pour ce type d'études précliniques. Le choix du modèle souris a été validé avec le client qui possède déjà d'autres données expérimentales sur ce modèle et qui souhaite le conserver à des fins de comparaison et reproductibilité par rapport aux études antérieures.

Un total de 38 souris db/db sera utilisé, divisé en :

- 4 groupes de 8 animaux (Groupes Composé X Dose 1, Composé X Dose 2, metformine et véhicule) utilisés pour l'étude pharmacodynamique.

- 2 groupes de 3 animaux (Groupes Composé X Dose 1 ; Composé X Dose 2) utilisés pour l'étude pharmacocinétique.

Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats obtenus lors d'études antérieures menées dans le cadre de notre R&D interne. Le nombre de 8 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

195- Aujourd'hui, la majorité des poulets expérimentaux mesurés de manière individuelle est identifiée par une bague alaire posée à la naissance. Lors des prises de mesures, les numéros de bagues des animaux sont lus puis saisis sur un ordinateur ou appareil d'enregistrement terrain afin de noter et d'enregistrer les mesures. Or des erreurs de lecture et de saisie des numéros de bagues peuvent survenir, entraînant une perte d'information.

Afin de fiabiliser les prises de mesure et de remplacer les bagues alaires, une expérimentation est mise en place.

Trois types de puces électroniques (identifiant les animaux individuellement) sont testés sur 300 poulets (100 poulets par type de puce) afin de choisir le meilleur en termes de tenue sur l'animal et de lecture. L'effectif animal de 300 est optimum pour avoir une idée précise de la qualité des puces et envisager son utilisation ultérieure en routine pour diminuer les effectifs animaux et préciser les mesures terrain par une meilleure qualité des prises de mesures (moins d'erreurs, utilisation d'appareils automatiques de prises de mesures sans contention de l'animal...).

Les poulets ne subissent aucune procédure expérimentale, sont élevés en groupe et au sol comme dans un élevage classique, ne subissent aucune mesure spécifique en dehors de la contention pour lire les puces électroniques et sont vendus en vif à la fin de l'expérimentation.

L'enjeu de l'essai est de trouver une puce électronique fiable dans le temps au niveau de la lecture électronique et de sa tenue sur l'animal et qui réponde au cahier des charges défini par les utilisateurs.

196- Notre plateforme IRM réalise une palette de prestations de service très large, allant de la mise à disposition des équipements IRM à la réalisation, par la plateforme, d'expériences IRM selon les besoins du demandeur.

Dans ce contexte, la plateforme est amenée à accueillir temporairement, à la journée, des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend.

Ces animaux sont déjà inclus dans une autorisation de projet rattaché à l'établissement utilisateur concepteur dont dépend le demandeur de la prestation de service. Ils entrent sur la plateforme IRM préclinique pour y subir un protocole d'imagerie puis repartent dans leur établissement d'origine ou sont euthanasiés sur place en accord avec le protocole expérimental.

Les objectifs de l'imagerie sont (i) la mise en évidence de lésions ou anomalies dans des modèles animaux de pathologies et l'identification de leurs caractéristiques physiologiques (métabolisme, perfusion, présence d'œdème, ...), (ii) le suivi de l'évolution de ces lésions et de leurs caractéristiques au cours du temps après traitement.

Cette demande a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'imagerie mis en œuvre sur la plateforme pour le compte des responsables de projet extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. La plateforme s'engage à vérifier que les projets qu'elle accueille ont reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche avant toute expérimentation dans ses locaux.

Les projets accueillis sur la plateforme concernant l'étude de pathologies et leur suivi thérapeutique, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire (nécessité de prendre en compte (i) les interactions des cellules malades avec les autres cellules de l'organe voire des autres organes, qui peuvent modifier le comportement et les réponses des cellules malades, et (ii) les modifications possibles du médicament dans l'organisme avant d'atteindre la cellule ciblée, ...) ou de simulation informatique (contextes innovants qui nécessitent des expériences pour alimenter les futures simulations).

Cette demande d'autorisation est formulée pour un quota de 500 rats et 500 souris sur une durée de 5 ans. Un décompte des animaux extérieurs imagés sera tenu et une nouvelle demande sera déposée si le quota est dépassé avant la fin de la période de 5 ans. Ce nombre d'animaux a été déterminé sur la base des statistiques d'utilisation de la plateforme des années précédentes. Il faut savoir que l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport aux statistiques car elle permet (i) de visualiser de façon non traumatique des lésions internes à l'animal, non visibles autrement, (ii) de constituer des groupes avec des lésions homogènes (en terme de taille ou caractéristique), (iii) de suivre les mêmes animaux au cours d'un traitement.

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

197- L'école de chirurgie est une structure regroupant des chirurgiens experts dans le domaine de la chirurgie viscérale investis dans la formation des jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage sur modèle porcin. L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte et laparoscopique.

Ecole de chirurgie regroupe donc:

- Une école de chirurgie ouverte et laparoscopique sur grands animaux (porcs), pour formation initiale des internes, puis de formation continue des chirurgiens praticiens

- Une plateforme d'apprentissage des nouvelles technologies et techniques opératoires.

En effet, la chirurgie et ses innovations récentes toujours plus performantes rendent nécessaire un apprentissage pratique car il n'apparaît pas éthique de débiter les interventions sur le patient sans un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur ou sur modèle animal

- Un plateau technique d'évaluation des dispositifs mis sur le marché, avec perfectionnement de l'implantation de matériel et familiarisation avec de nouveaux matériaux

- Parmi les alternatives actuellement évaluées et rapportées dans la littérature figurent les simulateurs de chirurgie. Cependant, les modèles disponibles sur le marché ne sont pas encore suffisamment performants pour permettre une réelle mise en situation

- le modèle porcin (animal vivant) est quand à lui un modèle bien évalué et présentant des similitudes dans son anatomie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes chirurgiens d'acquérir les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie laparoscopique.

198- La neurostimulation des racines sacrées (NRS) est un traitement récent des troubles de la motricité digestive au niveau du côlon et du rectum. Sa principale indication est l'incontinence anale, pour laquelle la NRS améliore la qualité de vie des patients en diminuant le nombre des fuites. Par ailleurs, plusieurs études préliminaires chez l'homme ont montré une efficacité dans la constipation ainsi que le syndrome de l'intestin irritable. Par ailleurs, une étude portant sur des patients avec incontinence et maladie inflammatoire (Crohn rectal) a montré une amélioration des symptômes à la fois sur la continence, mais aussi sur la maladie elle-même.

Néanmoins, dans cette étude préliminaire, il n'a pas été montré d'effet anti-inflammatoire propre de la NRS. Nous avons donc mis au point un modèle préclinique porcin pour étudier l'impact de la NRS sur la muqueuse rectale. Cette étude a clairement mis en évidence un renforcement de la barrière épithéliale intestinale, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques en cas de lésion de la barrière intestinale. Or les maladies inflammatoires comme la rectite présentent des lésions de la barrière épithéliale. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, Crohn et Rectocolite ulcéro-hémorragique (RCH), sont des maladies invalidantes, qui peuvent entraîner des douleurs, une altération majeure de la qualité de vie, et la nécessité de recourir à des interventions chirurgicales avec des séquelles parfois importantes en termes de transit intestinal. Leur traitement repose sur les corticoïdes et les immunosuppresseurs. Néanmoins, environ 20% des patients pour la RCH, et 80% pour la maladie de Crohn devront être opérés au cours de leur suivi. Dans ce contexte, le développement, pour les maladies inflammatoires, de traitements innovants comme la NRS pourrait représenter une alternative prometteuse, si des effets de renforcement et de reconstitution de la barrière intestinale ainsi qu'anti-inflammatoires étaient démontrés

Hypothèse: La neurostimulation peut avoir des effets anti-inflammatoires sur la muqueuse rectale, dans un modèle d'inflammation provoquée par des lavements au Trinitrobenzène Sulfonic Acid (TNBS).

Le nombre maximal d'animaux (porc) utilisés dans cette étude sera de 36, répartis en 3 groupes ; en effet 10 animaux par groupe semble un nombre minimal (règle des 3R) pour pouvoir correctement analyser et interpréter les résultats et ainsi établir des statistiques significatives.

199- La maîtrise des cycles sexuels dans les élevages de mammifères domestiques, particulièrement les ovins, porcins, caprins et bovins, est indispensable pour permettre un étalement annuel de la production du lait et de la viande et pour pratiquer l'insémination artificielle. Les traitements hormonaux utilisés pour la maîtrise de la reproduction miment un cycle sexuel et permettent la synchronisation et l'induction de l'œstrus (chaleurs) et de l'ovulation. Bien que ces pratiques zootechniques soient largement utilisées, un certain nombre de problèmes restent récurrents et conduisent à de mauvais résultats de fertilité chez les femelles traitées et inséminées. L'utilisation de ces hormones, extraites de tissus animaux, présente également un risque sanitaire potentiel pour les animaux d'élevages et, par conséquent, pour la qualité des produits dédiés à la consommation (lait, viande, produits laitiers).

C'est dans ce contexte et pour pallier à ces inconvénients que nous développons une méthode alternative aux traitements d'induction de l'ovulation ne présentant pas les défauts décrits ci-dessus.

Les molécules que nous avons développées ont été sélectionnées grâce à des essais in vitro réalisés sur des lignées cellulaires spécifiques. Cependant, les essais in vitro ne permettent pas de prédire l'effet de molécules sur la fonction de reproduction in vivo.

La fonction de reproduction chez les mammifères est le résultat d'une communication hormonale étroite et complexe entre l'hypothalamus, l'hypophyse, et les gonades.

Chacun de ces organes sécrète des hormones qui agissent, selon le moment du cycle sexuel, soit de manière négative, soit de manière positive, sur l'organe cible. Des modèles *in vitro* permettent d'étudier les effets de chacune de ces hormones individuellement, mais aucun ne permet d'analyser les effets des rétrocontrôles entre hypothalamus, hypophyse et gonades. De plus, au sein même de l'appareil génital, les différents organes sont constitués de différents types de cellules qui, en réponse aux hormones, sécrètent elles-mêmes d'autres molécules qui permettent l'interaction entre cellules ou entre organes. Les propriétés pharmacocinétiques des molécules sont des paramètres qui vont également interférer sur l'effet final et qui ne sont pas mesurables *in vitro*. Il n'est donc pas possible d'analyser les effets des molécules agissant sur la fonction de reproduction uniquement avec des modèles *in vitro*, ceux-ci ne pouvant refléter une telle complexité.

Nous souhaitons donc tester *in vivo* les molécules que nous aurons sélectionnées *in vitro*, afin d'évaluer si leurs effets observés *in vitro* s'observent également chez l'animal entier. Pour cela, deux bio-essais de la pharmacopée seront utilisés.

L'expérimentation sera réalisée sur des rats Wistar de 21 jours. Le nombre total d'animaux a été calculé en fonction du nombre de molécules à tester que nous estimons pouvoir obtenir au cours de cette année.

Deux types de procédures expérimentales seront réalisés: une chez le rat mâle et une chez la femelle. Six cent (600) mâles et mille trois cent (1300) femelles seront utilisés au maximum. Le nombre d'animaux par lot a été déterminé grâce à des résultats préliminaires, de manière à obtenir une puissance de test entre 70% et 90% avec un seuil de risque alpha de 0,05.

Il n'y aura aucune modification du mode d'élevage des animaux (pas d'isolement, de mise à jeun, ou de modification de la luminosité). Le seul acte réalisé sur l'animal vivant est une injection par voie sous-cutanée.

200- La myopathie centronucléaire autosomique dominante est une forme rare de myopathie congénitale due à des mutations du gène DNM2 codant la dynamine 2. Aucun traitement n'est à ce jour disponible et les mécanismes physiopathologiques sont encore largement ignorés. La dynamine 2 est une enzyme principalement impliquée dans les processus de trafic membranaire intracellulaire. Notre équipe de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes physiopathologiques de la pathologie et de développer des approches thérapeutiques. Dans ce contexte, un modèle murin exprimant une mutation de la dynamine 2 a été créé. Cette lignée de souris développe une myopathie progressive comparable à la pathologie humaine.

Trois axes de recherches seront développés dans les 5 prochaines années, nécessitant l'utilisation d'animaux:

- L'étude du trafic membranaire dans le muscle sain chez la souris. Notre but est d'invalider l'expression de protéines de la machinerie du transport membranaire dans le muscle mature de souris adulte afin de comprendre leur rôle dans le maintien de la structure et de la fonction musculaire.

- La caractérisation de l'atteinte musculaire par résonance magnétique nucléaire (RMN). Parmi toutes les techniques d'imagerie, la RMN permet d'étudier l'anatomie, la physiologie et la biochimie du muscle au cours d'un seul examen. En outre, le contraste intrinsèque du muscle par RMN permet de visualiser plus spécifiquement différentes variables, du tissu graisseux ou fibrotique à la perfusion et l'oxygénation.

- Le développement de stratégies de thérapie génique et pharmacologique. Plusieurs stratégies seront développées: i) la correction de la mutation au niveau de l'ARN messager de la dynamine 2, ii) l'inhibition de l'expression de la protéine mutée, iii) la stimulation de la voie d'autophagie par traitement pharmacologique ou par une alimentation spécifique. Pour les approches de thérapie génique, les animaux seront injectés avec un vecteur viral AAV sérotype 1 permettant l'expression musculaire des molécules thérapeutiques.

L'entretien des animaux et les expériences seront réalisés par un personnel titulaire des autorisations et formations nécessaires. Les animaux sont observés quotidiennement par l'animalier en charge de la lignée ou par les personnes en charge des protocoles. L'utilisation de vecteurs viraux de type AAV n'entraîne pas de douleurs et donc de mise en place de traitement particulier pour y palier. Pour tous les projets, des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur excessive (retrait ou vocalisation excessive à la manipulation, prostration ou agitation anormale) seront considérées comme critères d'arrêt et conduira à l'euthanasie des animaux concernés par dislocation cervicale. Des études précédentes sur nos différents projets ont permis de déterminer le nombre minimum de souris à utiliser afin d'évaluer de façon correcte les paramètres observés (entre 6 à 8 souris par groupes expérimentaux). Les analyses statistiques sur les paramètres mesurés sur ces groupes de petite taille sera réalisée par un test non paramétrique de type Mann-Whitney.

L'ensemble de ces projets nécessite l'utilisation de 40 souris C56BL/6 sauvages et 864 souris KI-Dnm2^{R465W} (sauvages et hétérozygotes) dans les 6 procédures expérimentales pour les 5 ans du projet.