



**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 (13)

1301- L'activité de recherche de l'équipe porte sur les tétraspanines. Il s'agit de molécules de la surface des cellules impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme 1) le CD9 et le CD81 dans la fusion des gamètes, c'est-à-dire l'ovocyte et le spermatozoïde,) qui dans le processus de reproduction permet le mélange des matériels génétiques issus de la mère et du père et le développement de l'embryon puis de l'organisme, 2) l'infection hépatique par Plasmodium, l'agent du paludisme (CD81), 3) le processus invasif tumoral et métastatique (Co029, CD9, CD151). La fonction de la plupart des tétraspanines à l'échelle de l'organisme est mal connue. Une des approches les plus fructueuses pour faire avancer la connaissance dans ce domaine est l'établissement de lignées de souris mutantes. Par l'approche dite d'invalidation génique chez la souris, technique par laquelle on bloque complètement l'expression d'un gène, il a été montré que la tétraspanine CD9 était nécessaire à la fusion des gamètes. De même l'expression de la tétraspanine CD81 est requise pour l'infection hépatique par Plasmodium, ce qui a été mis en évidence grâce aux études sur les souris invalidées pour CD81. D'autres exemples issus de divers laboratoires ont apporté des contributions importantes pour la connaissance de la biologie des tétraspanines par l'utilisation des modèles murins. Pendant longtemps, le CD9 a été la seule molécule de la membrane de l'ovocyte connue pour être nécessaire à la fusion des gamètes. Plus récemment une autre molécule appelée Juno qui est le récepteur de la molécule Izumo du spermatozoïde s'est avérée être également nécessaire à la fusion des gamètes. Le couple moléculaire Juno-Izumo semble intervenir dans l'adhérence mais n'est pas suffisant pour produire la fusion. L'hypothèse est formulée du rôle de CD9, et peut-être également de CD81, comme des organisateurs moléculaires à la surface des gamètes qui feraient progresser le processus d'adhérence entre les gamètes vers la fusion de leurs membranes. Pour analyser ce processus il est nécessaire de disposer d'ovocytes de souris sauvages ou déficientes en CD9 et/ou CD81 et de suivre les mouvements moléculaires des autres molécules dans ce contexte. Une bonne compréhension des mécanismes de la fusion des gamètes est nécessaire pour envisager d'améliorer les thérapies de la stérilité et de développer des méthodes contraceptives moins toxiques. Il s'agit donc d'une approche in-vivo/in-vitro dans la mesure où il n'est pas encore possible de produire en culture des ovocytes ou des spermatozoïdes capables de fusionner. Les souffrances infligées aux animaux sont très légères puisqu'il s'agit principalement d'injections pour déclencher l'ovulation et d'euthanasie par gradient de CO₂. Pour ce projet nous estimons à 625 le nombre de souris que nous utiliserons. Règle des 3 R - Les 2 procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées liées à l'euthanasie par gradient de CO₂. Pour des raisons scientifiques et éthiques, nous tenterons de remplacer les ovocytes par des cellules en culture dans lesquelles on peut exprimer les molécules nécessaires à la fusion avec le spermatozoïde. Le nombre d'ovocytes utilisés est réduit de manière à utiliser peu de souris femelles dans chaque expérience.

1302- Une diminution progressive de la fertilité des bovins laitiers a été observée parallèlement à l'augmentation de la production de lait par animal ces dernières décennies. Un facteur majeur conditionnant la période fertile et la réussite à l'insémination est la migration de spermatozoïdes mobiles depuis leur lieu de dépôt dans les voies génitales jusqu'au site de la fécondation, dans l'oviducte. Cependant, cette étape de migration et de conservation spermatique reste une boîte noire pour laquelle les observations sont difficiles. L'enjeu du projet présenté dans cette demande est de développer une technique de phénotypage non invasive permettant de caractériser la migration et la mobilité des spermatozoïdes dans le tractus génital in vivo après insémination chez les bovins. Le projet se décompose en deux étapes successives dont une première phase de mise au point de la technique de micro-endoscopie confocale, déjà utilisée chez la brebis, pour visualiser et quantifier la migration in vivo des spermatozoïdes depuis le corps utérin jusqu'à la jonction utéro-tubaire en utilisant 4 génisses issues d'un projet antérieur. Si cette mise au point n'est pas concluante au bout du temps initialement alloué (6 mois), le projet prendra fin. Dans le cas contraire, des mesures de la migration spermatique in vivo en période fertile seront effectuées chez deux lots de 8 génisses de race Prim Holstein à index « synthèse de fertilité » contrasté et sur 4 cycles sexuels successifs. Le phénotypage fin de ces deux populations extrêmes permettra d'évaluer la variabilité intra et interindividuelle des paramètres mesurés dans un objectif de sélection. Le projet présenté répond donc à la règle des 3R: (1) REMPLACEMENT: compte-tenu de l'objectif même de l'étude qui vise à comprendre la migration spermatique in utero, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in silico ; (2) REDUCTION: le projet étant construit en 2 phases distinctes permet de s'assurer de la réduction des effectifs de cette approche très exploratoire puisque 4 femelles seront utilisées dans la phase de mise au point puis, en cas de

succès 2 lots de 8 génisses pour évaluer la variabilité phénotypique sur les caractères qui seront mesurés; (3) RAFFINEMENT: les génisses utilisées dans lce projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (10m² par animal avec un accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des applombs, accès à des brosses latérales et dorsales...). D'un point de vue scientifique, ce projet apportera donc des réponses importantes pour la compréhension des mécanismes à l'origine de la non fécondation/mortalité embryonnaire précoce en hausse chez les bovins laitiers. D'un point de vue génétique, ce projet permettra de progresser dans la recherche de marqueurs génétiques liés à la capacité des femelles à soutenir la migration spermatique pour la sélection de femelles plus fertiles.

1303- Le cancer colo-rectal est actuellement le 2ème cancer en terme de mortalité avec 17 000 décès en France en 2012 et le 3ème en terme d'incidence avec 39 000 nouveaux cas. La pathogénie est actuellement bien connue et implique la transformation de la muqueuse colique en adénome puis la dégénérescence vers le cancer. Nous estimons qu'environ 1 polype adénomateux sur 10 va dégénérer en cancer. Actuellement, le principal moyen de prévention repose sur la coloscopie et la possibilité de résection des polypes adénomateux. Le traitement endoscopique par résection des polypes est efficace. Son taux de morbidité est faible, mais au vu du nombre élevé d'exams réalisés (1,2 million de coloscopie par an en France en 2012), elle n'est pas négligeable. Les perforations coliques représentent selon les séries entre 1 et 20/1000 alors que les hémorragies retardées représentent 7% des patients après résection endoscopique d'une lésion de plus de 10mm. Ce taux pourrait même être supérieur en cas de traitement anticoagulant associé. Actuellement, aucun traitement préventif, visant à favoriser la cicatrisation muqueuse, n'a prouvé son efficacité. Le butyrate est un acide gras présent dans la lumière du tube digestif à l'état physiologique. Il représente environ 8% des acides gras à chaîne courte dans le colon. Ces acides gras à chaîne courte dérivent du métabolisme des sucres alimentaires par le microbiote intestinal. De nombreuses études ont concerné le butyrate et ont permis de caractériser plusieurs propriétés : un effet antinéoplasique, une diminution du stress oxydatif, une neuromodulation du système entérique et un effet anti-inflammatoire sur la muqueuse du tube digestif. Plusieurs études cliniques ont permis de montrer l'efficacité d'un traitement par butyrate (sous forme de lavement intra-rectal) dans des atteintes inflammatoires du tube digestif : rectite radique, colite d'exclusion, pouchite. Son efficacité dans le traitement des formes distales de maladies inflammatoires chroniques reste en revanche débattue. L'effet d'un traitement par butyrate sur la cicatrisation muqueuse après lésion endoscopique n'a en revanche jamais été étudié. En parallèle, 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. Plusieurs études préliminaires chez l'homme ont montré une efficacité dans la constipation ainsi que dans le syndrome de l'intestin irritable. Par ailleurs, une étude portant sur des patients avec incontinence anale 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. En effet les résections endoscopiques des muqueuses comportent de nombreuses indications sur l'ensemble du tube digestif (résection de lésions précancéreuses coliques notamment) et sont un acte clinique fréquent. Les principales complications de ces traitements, sont les hémorragies aiguës ou retardées et les sténoses cicatricielles qui peuvent conduire à des hospitalisations et possèdent une morbi-mortalité certaine. Différentes approches thérapeutiques pour prévenir ces complications ont été proposées, par exemple, l'utilisation d'anti-TNF dans l'amélioration de la réparation muqueuse, la greffe de cellules orales autologues, ou la transplantation tissulaire de muqueuse digestive. A cause de l'efficacité partielle de ces traitements, il existe un fort besoin pour développer d'autres approches innovantes mini-invasives. Des études récentes in vivo ont permis de montrer que l'activation du système nerveux entérique, en particulier via la NRS et la stimulation vagale était capable d'activer les cellules gliales entériques, et de contribuer au renforcement et à la protection de la barrière épithéliale. Néanmoins, le rôle de la stimulation vagale et/ou sacrée dans les processus de réparation muqueuse reste à ce jour à déterminer. Ce projet, faisant suite au projet antérieur autorisé, cherche à évaluer les effets d'une neurostimulation ou d'un traitement au butyrate sur la réparation/cicatrisation de la muqueuse digestive suite à des lésions endoscopiques rectales. Nous souhaitons également déterminer la capacité des cellules gliales à favoriser la réparation/cicatrisation en greffant ces cellules autologues dans les berges d'ulcères. Dans ce projet, nous utiliserons un maximum de 40 porcs (6 porcs par groupe+2 porcs si besoin). Les groupes étudiés dans ce projet seront comparés aux groupes déjà étudiés lors du projet antérieur (y compris groupe contrôle) selon la règle des 3R. L'ensemble des procédures suivra le principe des 3R: limitation des effectifs (6 par groupe), raffinement: condition d'hébergement en box individuel, diminution du stress, de la souffrance et de la douleur: les procédures de ce projet sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement antalgique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

1304- La maladie (ou « démente ») à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer (MA). Ainsi elle représente 20% des patients déments. La maladie commence entre 50 et 85 ans. Le nombre de patients avec une MCL en France est estimé à environ 200000 sujets. Il s'agit donc comme pour la MA d'un enjeu majeur de santé publique. Les symptômes habituels de la MCL associent des troubles cognitifs comme par exemple des troubles de la mémoire, des troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), un syndrome parkinsonien -souvent discret en début de maladie- et des fluctuations attentionnelles. Au niveau cérébral, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats de protéines α -synucléines, formant ce que l'on appelle les corps de Lewy. On retrouve

ces agrégats également dans la maladie de Parkinson (MP), sauf qu'ils sont localisés dans une structure bien particulière (la substance noire) alors qu'ils sont plus diffus dans l'ensemble du cerveau dans la MCL. Les modèles animaux existant à l'heure actuelle sont créés pour modéliser la maladie de Parkinson et présentent souvent cette atteinte prédominante de la substance noire. Un facteur de risque de la MA, l'apolipoprotéine E (APOE4), est également retrouvé dans la MCL. Cependant, alors que la MP présente les mêmes types d'agrégat que pour la MCL, l'APOE4 n'est pas un facteur de risque dans cette pathologie. Dans ce projet, nous proposons de créer et caractériser un modèle double transgénique de la pathologie (APOLEWY), dans lequel l' α -synucléine humaine est co-exprimée avec l'APOE4 humaine. Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, les mêmes groupes d'animaux subiront l'ensemble des tests comportementaux et ce seront ces mêmes groupes qui seront analysés à la fin dans le but de mettre en évidence les caractéristiques de la pathologie au niveau du cerveau. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous travaillerons qu'avec des souris mâles, qu'en plus de notre groupe APOLEWY, nous constituerons plusieurs groupes contrôles, groupes que nous étudierons à différents âges, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 300 souris. Afin de minimiser l'angoisse, la douleur et de la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage et de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction).

1305- La recherche préclinique *in vivo*, consiste à explorer en utilisant les modèles animaux pathologiques qui sont les plus proches de la pathologie humaine, les mécanismes qui aboutissent à l'apparition de la maladie, pour mieux la comprendre et pour ensuite développer des futurs traitements pour la combattre. Cette science est, par définition consommatrice d'animaux. La volonté du chercheur est toujours d'obtenir un plus grand nombre d'enseignements à partir de ses procédures expérimentales et de la technologie dont il dispose. Il se doit de respecter les règles éthique des 3 R's envers l'animal et les principes qui gouvernent la pratique de l'expérimentation sur animaux vivants, un de ces fondements vise notamment à réduire le nombre d'animaux utilisés. Cela conduit à la fois le concepteur de nouvelles technologies et le chercheur qui les utilise à adopter une attitude responsable qui puisse satisfaire à toutes ces exigences. Les évolutions technologiques, cette prise de conscience de l'expérimentateur et la législation contribuent à réduire le nombre d'animaux utilisé et surtout à protéger l'animal de l'inconfort et de la douleur. Les études qui sont menées sur des longues périodes, imposent parfois de réaliser au cours du temps plusieurs examens, à différents stades de l'évolution ou de la régression de la maladie. Dans certaines situations, seul l'examen clinique post mortem est possible, ces cas sont les plus consommateurs d'animaux. Dans le cadre de nos projets de recherche qui sont orientés vers les maladies du foie et du système digestif, il est nécessaire d'explorer les organes de la manière la plus fine possible, c'est-à-dire au niveau de la cellule pour évaluer les dommages subis par l'évolution de la maladie étudiée. Les méthodes de références pour ces analyses sont celles qui sont pratiquées par les histopathologistes à partir de biopsies (petit fragment de l'organe étudié) prélevées sur l'animal en cours d'étude ou le plus fréquemment à partir de l'organe entier prélevé sur l'animal euthanasié en fin d'étude. Chez l'animal de laboratoire de petite taille, le prélèvement de biopsies n'est pas aisé, et c'est plus généralement la seconde solution qui est employée. Des technologies élaborées utilisant des microscopes permettent d'étudier les tissus à l'échelle de la cellule avec en plus une dimension de profondeur en plus de la microscopie classique ont été largement développées et ont même fait l'objet de l'apparition de dispositifs permettant d'explorer *in situ* chez le patient en complément des méthodes usuelles classiques d'imagerie médicale les sites qui peuvent présenter des lésions. La technologie a aussi été mise à la disposition des laboratoires de recherche, elle permettrait de pouvoir réaliser sur un même animal un suivi longitudinal de l'évolution d'une pathologie, contribuant ainsi à la réduction du nombre d'animaux nécessaire, mais aussi à accroître le niveau de précision des informations recueillies. Notre objectif n'est pas de substituer par cette nouvelle technologie la méthode de référence, mais d'améliorer la qualité de nos résultats expérimentaux tout en contribuant à la réduction du nombre d'animaux engagés dans nos travaux. Ce projet fera appel à des rats chez lesquels une pathologie hépatique déjà maîtrisée au laboratoire aura été induite et chez lesquels sera évalué le dispositif d'imagerie confocale. Un total maximum de 240 animaux pourrait être utilisé pour ce projet qui contribuera à significativement réduire le nombre des animaux utilisés dans les procédures ultérieures qui feront appel à cette technologie. Les procédures expérimentales qui seront décrites dans ce dossier de demande d'autorisation de projet consisteront à détailler les méthodes de préparation et d'instrumentation des animaux destinés à évaluer la technologie dont il est question. Les méthodes utilisées sont qualifiées de peu invasives car nécessite que l'introduction d'une sonde au travers d'une simple aiguille pour atteindre l'organe à visualiser, les gestes sont pratiqués sous anesthésie et l'utilisation d'analgésiques locaux permettront d'atténuer la douleur au lieu de l'injection. Réduction du nombre d'animaux utilisé, raffinement des procédures par l'emploi des produits analgésiques, et remplacement de technologies par des méthodes innovantes plus performantes sont les bénéfices escomptés à mettre en avant pour justifier ce projet.

1306- Bien que certaines fonctions cognitives soient altérées dans les populations âgées ne souffrant pas de pathologies neurodégénératives avérées, par rapport à des populations plus jeunes, des études longitudinales ont montré que ces fonctions ne déclinaient que peu ou pas au cours du vieillissement, chez certaines sujets. L'identification de facteurs associés à cette variabilité ainsi que de leurs corrélats neurobiologiques constitue une facette importante des recherches actuelles en

neurosciences cognitives. Parmi ceux-ci, les facteurs liés aux expériences de la vie (niveau d'étude, activités professionnelles et de loisirs) auraient un impact profond sur le vieillissement cognitif. Ce sont ces facteurs, modélisés par des conditions d'hébergement différenciées, dont nous étudions l'impact sur le vieillissement neurocognitif chez le Rat, depuis plusieurs années. Sur le plan cognitif, nous avons en particulier montré que l'hébergement des animaux dans un milieu riche en stimulations cognitives, physiques et sociales (milieu enrichi) pendant toute leur vie adulte avait un effet bénéfique sur la navigation spatiale d'animaux moyennement âgés et âgés, une capacité cognitive dont le déclin est bien établi chez l'Homme et qui contribue à l'altération de la vie quotidienne du sujet âgé. En utilisant ce modèle, ce projet a pour objectif d'évaluer, au niveau neurobiologique, l'hypothèse selon laquelle l'effet bénéfique d'un hébergement en milieu enrichi serait sous-tendu par le maintien de la fonctionnalité d'une population particulière de neurones dont tant l'implication dans la navigation spatiale chez l'animal adulte que l'altération au cours du vieillissement sont établies ; les neurones formés à l'âge adulte dans le gyrus denté (néoneurones). Les animaux nécessaires à ce projet seront successivement exposés à trois procédures : 1) un hébergement en milieu standard ou enrichi d'une durée variable en fonction de l'âge auquel les animaux seront testés, 2) un traitement systémique avec un marqueur et 3) un test comportemental à l'issue duquel les animaux seront mis à mort par injection d'une dose létale d'anesthésique. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une collaboration. Dans la mesure où ce projet porte sur l'identification de corrélats neurobiologiques aux performances cognitives, nous ne pourrons appliquer l'une des recommandations de la règle des 3 Rs, à savoir celle de Remplacer, et recourir à un modèle autre que celui de l'animal. En ce qui concerne la recommandation de Réduire, le nombre d'animaux nécessaires (108 au total) a été établi compte-tenu de la mortalité anticipée au cours du vieillissement, des pathologies cérébrales ne pouvant être déterminées qu'après la mise à mort (p.e. tumeur hypophysaire) et de la variabilité des performances qui s'accroît au cours du vieillissement. Les effectifs terminaux escomptés garantiront la validité des conclusions qui pourront être tirées de ce projet par un traitement statistique (n=8-12 par groupe). Par ailleurs, l'hypothèse originale que nous voudrions tester utilisera une procédure comportementale dont la pertinence pour l'étude de la neurobiologie du déclin cognitif du rongeur âgé est internationalement reconnue, garantissant l'utilisation des données qui seront acquises avec ce projet par une large communauté scientifique. En ce qui concerne la recommandation de Raffiner, les animaux de ce projet seront hébergés au laboratoire depuis l'âge de 4-5 semaines, dans des conditions garantissant leur bien-être, le contrôle que nous exerçons sur les conditions d'hébergement dans nos travaux consistant en leur enrichissement. Le traitement qui leur sera administré consistera en un petit nombre d'injections intra-péritonéales selon un protocole établi et validé par nos collaborateurs, cette voie d'administration étant peu douloureuse. Le stress occasionné par l'administration de ce traitement sera limité par le fait que nous réalisons ce type d'injection sans qu'il soit nécessaire de maintenir l'animal en contention. Enfin, le test comportemental prévu n'est pas douloureux et ne nécessite pas de limitation du bien-être de l'animal.

1307- Ce projet a comme but principal de mettre en évidence les mécanismes neurobiologiques responsables des effets positifs de l'exposition à un environnement stimulant sur l'addiction et plus particulièrement les risques persistant de rechute. Notre hypothèse de travail est que les drogues altèrent de façon durable le fonctionnement du cerveau et par conséquent, le comportement. Ainsi une exposition à un environnement stimulant contrecarrerait ces altérations et normaliserait le comportement addictif. Nous allons utiliser des modèles animaux d'addiction et nous allons les combiner avec des mesures neurobiologiques de changements cérébraux induits par la drogue et notamment des mesures d'imagerie cérébrale et d'électrophysiologie. En résumé, toutes les expériences auront 3 phases communes et une 4ème phase spécifique qui changera en fonction de la mesure réalisée. La phase 1 correspond à la chirurgie pour l'implantation d'un cathéter chronique dans la veine jugulaire des rats. La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue. La phase 3 correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats sont hébergés dans un environnement enrichi ou dans un environnement standard dans une pièce d'hébergement de l'animalerie et ils n'ont pas accès à la drogue. La 4ème phase consiste à étudier le fonctionnement cérébral en utilisant des techniques d'imagerie cérébrale avec une approche de microTEP (tomographie à émission de positrons) ou des techniques d'électrophysiologie in vivo pour étudier l'activité des circuits neuronaux du cerveau. Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut être uniquement mené sur un animal vivant. Néanmoins, nous avons pris en considération la règle de 3Rs (Réduire; Raffiner : observation des animaux, enrichissement du milieu, conditions d'hébergement réglementaire, diminuer la douleur, la souffrance et le stress imposé aux animaux; Remplacer) pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Pour cela, nous utilisons des méthodes expérimentales validées et reproductibles ainsi que des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettent de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes et de limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous avons calculé que pour cette étude 420 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement. Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

1308- La thérapie génique consiste à faire pénétrer, dans les cellules d'un malade, la copie normale d'un gène déficient ou un acide nucléique inhibant l'activité d'un gène délétère, afin de traiter une maladie d'origine génétique ou acquise. Son succès nécessite toutefois l'utilisation d'un vecteur permettant au matériel génétique de traverser les membranes cellulaires. À ce jour, de nombreux vecteurs d'acides nucléiques ont été développés, mais aucun d'entre eux n'a permis la mise sur le marché de médicaments internationalement reconnus et utilisés, principalement pour des raisons de toxicité. Notre laboratoire travaille à la conception de vecteurs de thérapie génique issus de la modification de composés présents naturellement et en grande quantité dans les membranes de nos cellules et, donc, potentiellement non toxiques. Ces composés sont conçus pour le traitement de pathologies respiratoires génétiques ou acquises, telles que la mucoviscidose, l'asthme ou la

bronchopneumopathie chronique obstructive. Ils font l'objet d'essais d'efficacité et de toxicité sur des cellules en culture, mais ils doivent également être évalués dans des modèles animaux. En effet, les modèles *in vitro* disponibles à ce jour ne recréent pas la complexité d'un organisme entier, ni les pathologies que nous souhaitons traiter. De plus, la législation sur le médicament exige le recours à l'expérimentation animale pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de tout nouveau médicament avant sa mise sur le marché. Notre projet prévoit l'évaluation de 15 vecteurs sur une période de 3 ans. Il sera réalisé chez la souris, qui est une des espèces de rongeurs couramment utilisées pour l'étude des pathologies respiratoires et les essais d'efficacité et d'innocuité des médicaments. Il nécessitera 918 animaux, dont 882 souris BALB/c qui, dans certaines expériences, seront prétraitées afin de recréer une inflammation respiratoire aiguë ou un asthme, et 36 souris portant une mutation du gène CFTR ($\Delta F508$ Cftr^{m1Eur}) comme modèle de mucoviscidose. Pour satisfaire aux exigences de la règle des 3R, seuls les vecteurs ayant fait l'objet d'une évaluation sur cellules en culture et présenté, dans ces expériences, une efficacité au moins égale à celle d'un vecteur de référence, seront évalués *in vivo*. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque vecteur subira une évaluation par étape, afin de ne retenir à l'étape suivante que les meilleurs composés. Chaque fois que possible, 4 animaux par lot seront utilisés contre 6 en temps normal, et plusieurs vecteurs seront évalués en parallèle. L'hébergement et les procédures expérimentales seront réalisés de telle sorte à garantir le bien-être des animaux et réduire au maximum le stress. Les expériences seront réalisées par une seule et même personne suivant des protocoles standardisés et les traitements seront réalisés sous anesthésie. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien basé sur l'apparence, l'abreuvement, l'alimentation, l'examen clinique, et le comportement de l'animal, afin d'évaluer la souffrance. L'utilisation d'anti-inflammatoires ou d'antalgiques pour remédier à la souffrance n'est pas souhaitable dans notre projet, car elle influencerait les données recherchées. En cas de souffrance, l'animal concerné fera l'objet d'un suivi intensifié. En dernier recours, il sera euthanasié sur la base de points limites bien définis.

1309- Les bactéries à Gram positif rassemblent des espèces qui sont des pathogènes majeurs associés à une grande morbidité et mortalité chez l'homme. Deux des espèces les plus préoccupantes sont *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. *S. aureus* appartient aux flores cutanées et des muqueuses humaines et animales, tandis qu'*E. faecalis* est une bactérie saprophyte du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Ces deux bactéries sont impliquées dans des pathologies variées et ont la capacité d'acquérir rapidement de nouvelles résistances antibiotiques, ce qui a contribué à leur émergence au cours de ces dernières années. *S. aureus* est un pathogène nosocomial préoccupant, étant la bactérie à Gram positif la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier, suivi par *E. faecalis*. La recherche de nouvelles cibles antibiotiques pour le traitement des infections à Gram positif a conduit à s'intéresser aux inhibiteurs de la synthèse des acides gras (AG). Les AG sont incorporés dans la membrane et assurent l'intégrité structurale et fonctionnelle de celle-ci. Chez les procaryotes, la synthèse des AG requiert un panel d'enzymes spécifiques des bactéries et constitue donc une cible de choix pour le développement de nouveaux antibiotiques. Nos expériences *in vitro* ont montré que les mutants de synthèse des AG d'*E. faecalis* et *S. aureus* sont incapables de croître *in vitro* sans apport d'AG exogènes. Cependant, la plupart des bactéries sont capables d'utiliser les AG présents dans le milieu extérieur. Toutefois, chez les bactéries à Gram positif, le devenir de ces AG est espèce-dépendant. L'AG pourra ou non être incorporé dans la membrane et certains AG spécifiques intervenant dans la fluidité membranaire sont absents de l'hôte. Il y a succès thérapeutique quand les AG de l'hôte, présents et disponibles dans l'organe infecté, ne compensent pas le défaut de synthèse endogène. Il est actuellement impossible de tester *in vitro* cette possible compensation. Ainsi, seule l'expérience chez l'animal permettra de définir si la synthèse des AG est une cible thérapeutique pour le traitement des infections systémiques à *E. faecalis* et *S. aureus*. La souris est l'animal de choix pour les expériences de virulence d'*E. faecalis* et de *S. aureus*. ; en effet, la répartition des différents lipides dans ses organes est similaire à celle de l'homme et, de plus, la cinétique d'infection et les organes cibles de ces espèces bactériennes semblent être les mêmes chez l'homme et la souris. Les souris seront infectées par voie intraveineuse avec des souches sauvages et mutantes dans la voie de biosynthèse des AG, d'*E. faecalis* et de *S. aureus*, permettant d'établir si l'absence de cette synthèse diminue, voire abroge, la virulence. Dans ce cas, cette synthèse serait une cible pour le design de nouveaux antibiotiques. Les animaux seront suivis et les mesures seront prises afin de réduire la douleur. Le nombre de 785 souris a été défini en accord avec la règle des 3R. Il est réduit au maximum et cependant suffisant pour pouvoir tirer des conclusions soutenues par l'analyse statistique.

1310- Le domaine des neurosciences est en pleine expansion du fait de l'urgence de mettre au point de nouvelles thérapies notamment dans les pathologies associées à des perturbations de la mémoire et de l'apprentissage. Dans les projets de recherche fondamentale et les projets de recherche et développement, l'étape impliquant l'utilisation des rongeurs dans des tests d'apprentissage et de mémoire est très souvent nécessaire pour valider la pertinence des hypothèses et/ou des traitements envisagés. La formation et l'expérience des expérimentateurs dans cette évaluation comportementale jouent un rôle clé dans le bon déroulement des projets et la qualité optimale des étapes de validation *in vivo*. Le but de ce projet est de proposer un stage de formation pour l'évaluation des performances d'apprentissage et de mémoire chez le Rat et chez la Souris. Cette formation est prioritairement axée sur les aspects pratiques de chaque étape d'une évaluation comportementale, c'est-à-dire du choix des tests comportementaux par rapport aux processus d'apprentissage et de mémoire analysés dans le projet, de leur mise en œuvre dans les meilleures conditions matérielles, de la manipulation adaptée aux sujets d'expérience pour obtenir des performances reproductibles et fiables, et enfin l'analyse pertinente des données comportementales obtenues pour éviter les principaux risques de biais d'interprétation. Chaque binôme de stagiaire (niveau I exigé) effectuera lui-même la passation de deux animaux (1 par stagiaire) par test sous le contrôle et suivant les conseils de l'intervenant le plus

expérimenté pour ce test dans l'équipe des formateurs. Chaque test sera réalisé des premières étapes de familiarisation au test à l'obtention du résultat final pour assurer une bonne intégration de chacune des étapes par les stagiaires.

Règle des 3R. Remplacement: Le but du stage est de donner toutes les informations et le savoir-faire nécessaire à la réalisation des tests par le stagiaire dans le cadre de ses propres projets. L'acquisition du savoir-faire nécessite la manipulation des animaux afin de permettre au stagiaire d'apprendre à adapter ses gestes en fonction du comportement de son sujet. Raffinement : Le choix des tests a été guidé par leur popularité actuelle dans le domaine et le choix de l'espèce (Rat ou Souris) par son adaptation naturelle à réaliser le test avec un minimum de stress. Par exemple, les tests aquatiques sont réalisés uniquement chez le Rat car il évolue naturellement dans ce milieu qui stresse plus la Souris. Les animaux seront manipulés au préalable pour faciliter leur contact avec les stagiaires et le fort taux d'encadrement permettra de veiller au bien être des animaux à chaque étape de manipulation. Les sujets d'expériences seront hébergés par groupes de 2 au minimum avec des éléments d'enrichissement dans la cage. Chaque individu sera néanmoins testé individuellement pendant la période de test. Réduction : Le nombre d'animaux est limité à 1 animal par test et par stagiaire. Il dépendra donc du nombre de stagiaires, mais n'excèdera pas 30 rats et 30 souris par stage (donc 150 rats et 150 souris pour 5 ans).

1311- Avec 4% de la population adulte française atteinte d'apnées du sommeil et un recours croissant aux dispositifs médicaux de pression positive continue, le syndrome d'apnées du sommeil (SAS) constitue un enjeu sanitaire et économique majeur. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont la pression positive continue (PPC) et/ou l'orthèse d'avancée mandibulaires (OAM). En effet, ce trouble respiratoire est un facteur de risque de complications cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle (HTA), maladie coronarienne, insuffisance cardiaque ou encore accident vasculaire cérébral. Le syndrome d'apnées du sommeil doit donc être considéré comme une des maladies chroniques à l'origine d'une multi-morbidité et justifiant une prise en charge par des thérapeutiques combinées. Aussi, d'autres approches (ex : pharmacologie, entraînement) de cette pathologie reste une voie d'exploration intéressante pour compléter ces dispositifs de ventilation/dentaire et rendre plus efficace le traitement du SAS. L'hypoxie intermittente (HI) composante majeure du SAS, est considérée comme responsable des effets délétères sur l'organisme : ce manque d'oxygène épisodique entraîne, cependant, des conséquences différentes selon les organes considérés. Nous avons décidé de nous intéresser à l'effet de l'HI sur les cellules musculaires lisses qui composent les vaisseaux du système cardiovasculaire. Parmi les conséquences possibles sur les fonctions du tissu musculaire, nous faisons l'hypothèse de modifications profondes dans les mécanismes de régulation du calcium de ces cellules en accord avec nos précédents résultats. Objectifs : 1) Mettre en évidence les conséquences de l'HI sur le tissu musculaire 2) Etudier l'effet de l'entraînement du modèle rat sur ces paramètres 3) Comparer l'impact de l'HI sur d'autres tissus musculaires (muscles squelettiques). Pour cette étude, nous allons utiliser le modèle murin mis en place dans le laboratoire depuis de nombreuses années : le modèle rat sera préféré au modèle souris pour des raisons de quantité de prélèvement. Les animaux seront soumis à 3 semaines d'hypoxie intermittente (5% O₂ + 95% N₂) ou de normoxie (21% O₂ + 79% N₂) selon leur statut. 4 conditions sont testées pour rendre compte d'une part de l'impact de l'hypoxie intermittente sur les individus et tissus (versus normoxie) et d'autre part de l'effet de l'entraînement sur les paramètres physiologiques observés a) hypoxie intermittente versus normoxie, b) entraînement versus sans entraînement (sédentaire) : 80 rats Wistar mâles sont ainsi nécessaires. Nous veillons bien évidemment à réduire le nombre d'animaux pour cette étude mais l'échelle physiologique de cette étude ne nous permet pas de nous soustraire du modèle animal si nous souhaitons répondre de façon intégrée à cette problématique. De la même manière que certains paramètres physiologiques ne peuvent être enregistrés uniquement sur animal in vivo, les données sur la signalisation calcique ne peuvent être produit qu'à partir de cellules issues des individus soumis à différents environnements (e. g. hypoxie intermittente, entraînement intensif) dont les impacts sur l'organisme sont complexes.

Afin de s'affranchir d'autres paramètres de stress environnementaux qui pourraient parasiter nos données, nous attachons une importance particulière au bien-être de notre modèle animal. Ainsi, nous mettons en place une semaine de stabulation minimum après l'arrivée des animaux afin que ces derniers s'habituent à leur nouvel environnement, nous veillons à ce que leur milieu soit enrichi par la présence d'objets récréatifs. Concernant la variation d'oxygène, un système d'hypoxie permet d'apporter dans chaque cage le mélange de gaz préalablement établi : l'air de la cage est ainsi renouvelé toutes les 30 secondes grâce à une entrée et une sortie de gaz à chaque extrémité du compartiment, ceci de façon complète et rapide. Concernant les animaux entraînés, un protocole d'entraînement a été établi d'après les études précédentes : nous avons arrêté un programme de deux fois 24 min (vitesse allant de 16 à 30 m/min avec une incrémentation de 2 m/s toutes les 3 minutes) séparé par 30 min de repos. La vitesse maximale atteinte correspond à 70% de la VMA (vitesse maximale aérobie) qui est un critère de choix pour l'entraînement. Nous visons, par cette étude, à renforcer la compréhension des mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'atteinte de cardiovasculaire dans le SAS ; la mise en évidence précise de ces mécanismes permettra de poser les bases d'une approche pharmacologique de certaines complications comme l'HTA.

1312- La chirurgie des tumeurs cérébrales situées dans l'hémisphère dominant du cerveau constitue un enjeu thérapeutique majeur.

En effet on sait que le pronostic à long terme de tumeurs qui sont fréquentes chez le sujet jeune (tumeurs gliales de bas grade) est directement lié au caractère extensif de la chirurgie. L'enjeu majeur est de pouvoir réaliser la chirurgie sans infliger au patient un handicap majeur notamment dans le domaine linguistique. En pratique ces patients sont opérés selon une procédure particulière qui permet de les réveiller en cours d'intervention et de tester formellement si les régions infiltrées par la tumeur sont impliquées dans le langage. Cette procédure est longue souvent pénible parfois insupportable pour certains patients. En effet elle exige d'explorer par électrostimulation la surface du cerveau tout les 5 mm tout en faisant parler le

patient. On sait que quand une région cérébrale s'active les petits vaisseaux se dilatent et le débit de sang augmente à la surface du cerveau. La visualisation directe par le chirurgien de ces régions permettrait de considérablement raccourcir le temps exploratoire et donc la pénibilité de la chirurgie. Ceci est potentiellement réalisable par une technique optique appelée interférométrie laser de tavelure ou « laser speckle » en anglais cependant il n'existe aucun appareil commercialisé dédié à l'analyse de la surface du cerveau humain. Dans un premier temps nous avons procédé à un essai clinique avec un appareil dédié à l'analyse de la surface de la peau. Malgré les artefacts majeurs liés au mouvement et la difficulté à discerner des modifications à l'œil nu l'analyse différée était encourageante. Nous avons donc mis au point un prototype miniature avec une chaîne de traitement approprié du signal. Les essais cliniques de visualisation des modifications de débit sanguin sur l'avant-bras de volontaires se sont avérés positifs. Cependant le laser speckle étant par définition sensible au mouvement nous ne pouvons formellement exclure que les modifications observées soient pour tout ou partie dues à l'utilisation d'un garrot pneumatique déformant la surface cutanée. A ce point de notre étude nous avons clairement besoin de vérifier si notre prototype donne bien l'information attendue lors de modifications du débit sanguin cérébral avant de passer à la réalisation d'un imageur « speckle-laser » utilisable chez l'homme. C'est la raison pour laquelle nous sollicitons l'autorisation de procéder à une expérimentation chez le petit animal. Notre intention est d'exposer la surface du cerveau chez l'animal anesthésié, d'induire une modification du débit sanguin cérébral qui pourra être quantifié par notre imageur. Les premiers essais de notre imageur miniature nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires à cette expérimentation et il n'existe aucun autre procédé technique mimant la vascularisation cérébrale ou clinique (le seul modèle étant la rétine qui ne peut être illuminée par ce type de faisceau laser) pouvant nous permettre de remplacer cette expérimentation afin de valider le fonctionnement de notre prototype. Dans un souci de raffinement l'acquisition de cette base de données doit nous permettre d'améliorer notre traitement du signal en temps réel sans qu'il soit nécessaire de recourir ultérieurement à une autre expérimentation. Le nombre d'animaux nécessaire (trois groupes de 12 soit 36 rats) a été réduit au maximum et est justifié par la puissance statistique nécessaire (analyse de variance) pour comparer les résultats obtenus avec trois puissances laser différentes.

1313- Projet pédagogique d'entraînement chirurgical d'internes d'urologie en formation avant la prise de fonction de chirurgien.

L'objectif du projet est de permettre aux participants d'être confrontés à toutes les difficultés liées à l'installation et à la stratégie chirurgicale ce qui les préparera à leur future fonction. Il s'agit également de répondre à la demande de la Haute Autorité de Santé qui précise qu'aucun acte ne soit réalisé directement sur le patient. Ces enseignements pratiques seront réalisés en binôme et en autonomie (un animal pour deux) encadrés en continu par des chirurgiens référents. Les chirurgiens référents pourront guider voire aider un binôme en cas de difficulté. Les participants devront pratiquer les techniques chirurgicales selon les mêmes principes et la même rigueur qu'une intervention chez l'humain. La formation de 2 niveaux sera organisée selon l'ancienneté de l'interne : Niveau I : Un programme de 4 séances est prévu pour les internes de milieu d'internat. Pour chaque séance il y aura 3 postes de travail. Les étudiants regroupés en binôme réaliseront une intervention urologique fréquente à chaque séance. Ce programme sera répété 4 fois/an afin de former au total 24 étudiants. Niveau II : Un deuxième programme de 4 séances également est prévu pour les internes en fin de formation (9^{ème} semestre minimum d'internat). Pour chaque séance il y aura 2 postes de travail. Les étudiants regroupés en binôme réaliseront une technique de coelochirurgie. Ce programme sera répété 2 fois dans l'année permettant de former 8 étudiants en fin de cursus. Au total, au cours d'une année universitaire, 24 séances de quatre heures seront organisées. L'encadrement sera assuré par 12 chirurgiens urologues ou chirurgiens vasculaires expérimentés qui se relaieront à raison d'un encadrant par séance. Une séance d'évaluation finale permettra d'apprécier la progression des participants et de valider les acquis. Dans le cadre des 3 R et afin de réduire le nombre d'animaux, les étudiants internes seront d'abord formés au cours de leur première année d'internat à la pratique chirurgicale et à la simulation sur pelvitruiner, simulateur de coelioscopie, suture sur pieds de porc. L'utilisation du modèle porcin se justifie par les similitudes anatomiques pelviennes et abdominales (chirurgie rénale, prostatique, statique pelvienne, curages lymphatiques). La chirurgie sur animal vivant sous anesthésie générale permet de recréer toutes les contraintes d'installation et les risques per-opératoires (notamment hémorragique, splénique, digestif, rectal) auxquels les étudiants doivent être confrontés avant d'envisager d'opérer des patients en autonomie totale. Pour un bon apprentissage des techniques tout en limitant le nombre d'animaux il nous a paru essentiel de ne pas avoir plus de deux étudiants par animal. 32 étudiants/an (16 binômes). Au total, le nombre d'animaux estimé est de 64 porcs par an soit sur 5 ans 320 porcs. Chaque opération sera réalisée sous anesthésie générale et analgésie adaptées à l'acte chirurgical. En fin de procédure, les animaux étant sous anesthésie générale profonde recevront une dose létale d'euthanasiant.

1314- Au cours des quinze dernières années, l'identification de cellules souches au sein de tissus adultes et la démonstration de leur contribution à la régénération musculaire ont conduit à de nouvelles propositions thérapeutiques. Ainsi, la transplantation de populations progénitrices est aujourd'hui envisagée pour le traitement de maladies qu'elles soient d'origine génétique ou acquise pour lesquelles une atteinte de la fonction musculaire est avérée. C'est notamment le cas des dystrophies musculaires pour lesquelles nous avons présenté une preuve de concept avec une population de cellules souches résidentes du tissu musculaire (cellules MuStem) appliquée au modèle canin de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) dans un contexte de transplantation allogénique sous couverture immunosuppressive. Durant les deux dernières décennies, la prise en charge des maladies auto-immunes et des protocoles de transplantation d'organe comme de cellules a été hautement influencée par le développement de l'arsenal des molécules immunosuppressives. Si la cyclosporine (CsA) apparaît comme une des principales molécules immunosuppressives, son potentiel thérapeutique est limité par de nombreux effets indésirables parmi lesquels une toxicité à long-terme notamment musculaire avec une action délétère sur le potentiel

régénératif. Ces limites empêchent son application clinique dans les thérapies au long cours. Avec des modalités distinctes, le Tacrolimus montre des résultats meilleurs en termes de taux de survie de précurseurs myogéniques dans les études précliniques et cliniques, suggérant un intérêt de son usage dans les protocoles de transplantation. Les immunosuppressions mises en place chez le petit animal ont été invariablement adaptées à partir de la médecine humaine et appliquées empiriquement sans démonstration préalable de leurs propriétés pharmacocinétiques. Chez le Chien, peu de données sont disponibles sur les protocoles d'immunosuppression mis en place lors des essais de thérapie cellulaire ou d'allogreffes rénales.

L'objectif du présent projet est l'exploration de l'impact de molécules immunosuppressives sur le comportement des cellules MuStem, de sorte de définir un traitement immunosuppressif efficace dans le cadre d'une transplantation de cellules allogéniques sur un individu dystrophique. Les expérimentations développées auront pour finalité de dégager des notions sur la tolérance des traitements chez le Chien et de définir l'action de ces traitements sur les propriétés *in vitro* et *in vivo* des cellules MuStem candidates à la thérapie de la DMD. Ainsi, les résultats de ce programme auront un impact direct sur le champ des connaissances autour de l'interaction des molécules immunosuppressives avec les cellules progénitrices ainsi que sur la présentation de données précliniques autour du potentiel thérapeutique de ces cellules dans un contexte de transplantation directement transposable pour la mise en place d'essai clinique. Les expérimentations seront réalisées chez le chien golden retriever sain et dystrophinopathe (GRMD). Pour mener à bien l'ensemble de ce programme, un besoin de 24 chiens (12 sains et 12 GRMD) est déterminé. Pour chaque expérimentation, nous mettrons en œuvre les procédures d'anesthésie pour toutes les manipulations qui le nécessitent et les règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux.

1315- Les rayonnements électromagnétiques sont omniprésents dans notre environnement. Leurs effets sur les organismes vivants dépendent du niveau de champ, de la puissance et de la durée d'exposition.

Les champs électriques endogènes jouent des rôles importants en biologie (excitation nerveuse, transport d'ions, sécrétion d'hormones, stimulation de la division cellulaire, régénération de tissus), processus couplés au potentiel transmembranaire des cellules. Des impulsions électriques externes peuvent modifier le potentiel de repos des cellules et les perméabiliser. Des Applications ElectroMagnétiques développées pour la Défense (AEMD) émergent utilisant des Micro-ondes de Fortes Puissances qui utilisent des impulsions du même type : impulsions brèves, de forte amplitude sur des périodes limitées. Dans l'objectif de neutraliser l'électronique de l'adversaire sans atteinte des personnes, il est nécessaire de connaître leurs effets biologiques afin de déterminer leurs seuils de nocivité et les valeurs limites d'expositions pour les différentes formes d'ondes mises en œuvre. Certaines formes d'ondes entretenues ou de type Radar sont couvertes par les normes et instructions actuelles mais celles-ci sont basées principalement sur les effets thermiques. Il n'est pas exclu que d'autres effets athermiques existent. Pour les signaux impulsionnels brefs, tels que les signaux BUL (Bande Ultra Large), il n'existe pas de normes basées sur les effets athermiques. L'objectif du projet est de déterminer les effets sur le petit animal de deux types d'ondes, BUE (Bande Ultra Etroite) de types radar et BL (Bande Large) pouvant être générées par divers dispositifs AEM. Par des systèmes biologiques d'étude à complexité croissante (vésicules lipidiques, cellules en culture, sphéroïdes multicellulaires), nous n'avons montré aucun effet direct ou indirect de ces impulsions sur les membranes (déformation, perte d'asymétrie transverse, perméabilisation, fusion) ou sur les cellules saines (mortalité, perte de cohésion, altération du cytosquelette, prolifération). Cependant, le modèle de sphéroïde tumoral a montré des effets des deux types d'ondes sur la croissance des cellules.

Pour suivre les effets de ces ondes sur la croissance tumorale, des souris porteuses de tumeurs en sous cutané seront soumises à des impulsions générées par des systèmes de rayonnement électromagnétique, lors d'expériences en vraie grandeur.

Pour caractériser les effets directs sur la perméabilité des vaisseaux sanguins sains et tumoraux, nous utiliserons une approche de microscopie intravitale par fluorescence afin de pouvoir visualiser les phénomènes induits en temps réel. Une chambre dorsale sera greffée sur le dos d'une souris, donnant un accès direct au réseau sanguin, permettant ainsi d'étudier *in vivo*, au cours du temps, des réponses vasculaires dans le même animal. Des applicateurs d'ondes centimétriques compatibles avec les niveaux de champs recherchés et la bande passante des signaux seront utilisés et les expériences réalisées au laboratoire.

Ce projet nécessite l'utilisation de 570 souris. Ce nombre est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse des animaux. Ce projet a fait l'objet d'une évaluation par l'ANR en 2013 et a été financé pour une période de 4 ans.

1316- Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche qui vise à identifier des nouvelles molécules permettant de traiter les maladies auto-immunes (sclérose en plaques, psoriasis, arthrites rhumatoïdes, inflammations chroniques intestinales) L'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) est utilisée pour modéliser divers aspects de la sclérose en plaques (SEP) chez les rongeurs et sert de modèle d'étude des maladies auto-immunes. La SEP est un trouble neurologique complexe qui se présente sous multiformes, et qui se produit chez les jeunes adultes. Ses symptômes comprennent l'inflammation, la démyélinisation et la perte axonale. Les modèles animaux sont utilisés pour des recherches sur la physiopathologie de cette maladie, et servent à évaluer le potentiel des stratégies de protection ou de traitement qui comprennent par exemple : l'immuno-modulation, l'immuno-protection, la régénération axonale ou la réparation de la myéline.

Les caractéristiques multiformes-multiphasiques de scléroses multiples exigent que des modèles appropriés soient utilisés pour répondre à des questions spécifiques relatives aux différents stades de la maladie. L'EAE consiste à orienter l'activité du système immunitaire propre de l'animal contre sa myéline, ce qui induit une inflammation du système nerveux central et l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique. Cela provoque un syndrome neurologique chez l'animal, qui peut dans certains cas être suivi par une reprise partielle au cours d'une première phase chronique de rémission, cette phase est associée à une inflammation et une démyélinisation réversible. C'est à ce stade que nos travaux présentent un intérêt. Après cela l'animal va entrer dans la forme progressive, qui est associée à la démyélinisation chronique et la perte axonale. Au cours de ces différentes phases, il est possible d'évaluer différentes stratégies thérapeutiques. Nous avons fait le choix de focaliser nos travaux pendant la phase précoce et d'établir un modèle qui puisse nous permettre de développer notre stratégie d'immuno-modulation bien avant que les animaux n'entrent dans une phase sévère de la maladie. Ce choix de stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude. Notre projet consiste à intervenir sur l'immuno-modulation via une voie pharmacologique, réduisant de cette façon les phénomènes inflammatoires. Ce projet est constitué de différentes phases allant de l'implémentation dans notre laboratoire du modèle qui est très bien documenté dans la littérature, ce qui permet de réduire le nombre d'essais et par conséquent de minimiser le nombre d'animaux nécessaire au développement technologique, l'EAE une fois mise en place servira de modèle de criblage in vivo de molécules innovantes issues de la chimie médicinale. Il est crucial de préciser que notre stratégie consiste à développer un modèle de protection ou de retardement des effets délétères, c'est la raison pour laquelle nous envisageons de n'engager aucun animal dans des phases sévères de la pathologie. Néanmoins le processus complexe de protection via l'immuno-modulation requiert le recours à l'animal. Ce projet n'engagera qu'une seule espèce animale (la souris) et dans un nombre limité, qui est estimé à moins de 13356 animaux pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés. A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies auto-immunes, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

1317- Ce projet a pour objectif de rechercher des traitements efficaces des troubles cognitifs rencontrés dans la dépression majeure chez l'homme en utilisant un index à valeur translationnelle, l'onde P300 enregistrée par électroencéphalographie. Seule une recherche intégrée sur animaux vivants permet d'évaluer des fonctions aussi élaborées que la cognition mettant en jeu l'apprentissage et la mémoire. Ce travail expérimental sera réalisé en utilisant deux modèles animaux : un paradigme pharmacologique utilisant l'effet amnésiant de la scopolamine et une souche de rats pseudo-déprimés présentant des déficits cognitifs, les rats Wistar Kyoto. Un nombre total de 230 rats seront utilisés qui nous permettront de tester deux types d'antidépresseur, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine et un antidépresseur multimodal. Nous utiliserons 140 rats Sprague Dawley dans le paradigme pharmacologique et 90 rats Wistar Kyoto. Le nombre minimum d'animaux par groupe expérimental a été estimé à 10 à l'aide d'un test statistique d'analyse de puissance. De plus, pour limiter le nombre d'animaux, les enregistrements électroencéphalographiques et l'évaluation comportementale seront réalisés sur les mêmes rats traités. L'implantation des électrodes sera effectuée sous anesthésie générale et surveillance cardio-respiratoire jusqu'au réveil de l'animal. Les soins post-opératoires, avec analgésie locale si nécessaire, seront poursuivis jusqu'au rétablissement complet.

1318- Dans le diabète de type 1, un enjeu majeur de la recherche est la mise en place de traitements bloquant le processus auto-immun au stade de prédiabète. Le diabète de type 1 n'étant pas une pathologie morbide mais entraînant de nombreuses complications, il faut donc privilégier des approches visant les seuls lymphocytes T responsables de la destruction des cellules insulinosécrétrices comme des approches utilisant les antigènes (en l'occurrence un autoantigène) reconnus par les lymphocytes « auto-immuns » ou des fragments de ces antigènes (peptides) pour tolérer les lymphocytes T spécifiques seuls responsables de la maladie, comme on le fait avec les allergènes dans certaines allergies. Ces approches « vaccinales » se heurtent néanmoins à l'absence de modèles animaux qui permettraient de tester un antigène ou un peptide avant de l'utiliser chez l'homme car la séquence protéique de l'antigène diffère entre l'homme et les animaux de laboratoire couramment utilisés ainsi que les molécules qui présentent les fragments d'antigènes aux lymphocytes T (HLA) dont la spécificité est propre à chaque espèce. C'est pourquoi nous avons créé un nouveau modèle de souris, « humanisées », exprimant des gènes humains codant pour les molécules présentant les fragments d'antigènes aux lymphocytes T et pour la préproinsuline, auto-antigène majeur du diabète de type 1 : la souris YES. Cette souris ne développe pas spontanément de diabète. Seule l'introduction d'une modification génétique assez courante nous a permis de créer une souris développant de façon spontanée un diabète de type 1 ressemblant au diabète humain, la souris YES-RIP-hB7.1. La présente autorisation vise à dériver une nouvelle souris de la souris YES : une souris YES invalidée pour les gènes Rag1 et Rag2, créant ainsi un outil qui permettra de valider la caractérisation des fragments de l'autoantigène présentés aux lymphocytes T par les molécules HLA de façon identique à l'homme. Le transfert de la maladie par ces clones T identifiera les peptides de la préproinsuline qu'ils reconnaissent comme la cible potentielle des lymphocytes T dans la destruction des cellules insulinosécrétrices dans la maladie humaine. Afin d'appliquer la règle des 3R, des souris YES et YES-RIP-hB7.1 des deux sexes seront utilisées par groupes d'étude de 12 souris permettant une validité statistique de l'ensemble du projet. Les outils nécessaires à la transgénèse seront préalablement optimisés sur des modèles cellulaires permettant une stratégie plus efficace permettant de réduire le nombre de souris nécessaires à la création de la souris. Toutes les souris utilisées feront partie d'un élevage de souris saines, non diabétiques. Par ailleurs, les souris devenant diabétiques seront sacrifiées après confirmation du diabète le jour suivant pour expérimentation.

Le nombre total de souris nécessaire au développement de ce projet sera de 484 (64 pour la création de la lignée et 420 pour l'expérimentation).

1319- Chaque année, la mortalité pour cause cardiovasculaire est de l'ordre de 17 millions de personnes dans le monde. Une proportion importante de ces décès est liée à un arrêt cardiaque soudain, dont l'incidence en dehors du milieu hospitalier atteint 50 à 100 individus pour 100.000 habitants dans les pays industrialisés. Cela représente environ 40.000 décès par an en France. Même lorsqu'une réanimation a pu être mise en place rapidement, la reprise d'une activité cardiaque ne survient pas chez tous les patients. Il est donc proposé de recourir à des traitements complémentaires tels que l'assistance circulatoire extra-corporelle (ACE), qui permet d'assurer une perfusion tissulaire et l'oxygénation sanguine au cours de la réanimation. Les modalités idéales pour sa mise en place restent néanmoins incertaines et de nombreuses études cliniques sont actuellement en cours à ce sujet, notamment afin de déterminer les délais optimaux d'instauration. D'autres questions restent en suspens à propos de la hiérarchisation des soins, notamment par rapport à la revascularisation coronaire en cas d'infarctus du myocarde sous-jacent. Notre but est de déterminer si la revascularisation doit être réalisée en urgence lors d'arrêt cardiaque traité par ACE. Pour ce faire, il est indispensable de recourir à des modèles animaux compte tenu de l'aspect intégratif de cette situation et du traitement étudié. Cela sera réalisé chez des porcs qui constituent l'espèce de référence pour la recherche sur l'arrêt cardiaque. Plus précisément, nous étudierons la fonction cardiovasculaire dans un modèle d'arrêt cardiaque réfractaire chez des porcs traités par ACE et revascularisation précoce ou tardive de l'artère coronaire occlue. Nous prévoyons d'inclure 5 groupes expérimentaux d'environ 12 porcs chacun. L'usage de l'expérimentation animale ne peut pas être évité dans ce contexte puisqu'il s'agit de l'évaluation préclinique d'un dispositif médical. En effet, les agressions ischémiques systémiques sont des situations complexes impliquant de nombreuses interactions multiviscérales. Cette situation ne peut pas être mimée in vitro et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux minimum pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires et les animaux seront maintenus sous anesthésie jusqu'à leur euthanasie (Raffinement).

1320- L'endoscopie salivaire (ou sialendoscopie) est désormais l'examen de choix pour la prise en charge des pathologies obstructives des canaux salivaires (principalement calculs et sténoses canalaires) chez l'Homme. Elle permet un diagnostic de certitude et un traitement adapté dans le même temps opératoire, en conservant la glande et sa fonction et en évitant les complications de la chirurgie classique (risque nerveux, hématome...). Chez le patient l'endoscopie salivaire est réalisée le plus souvent sous anesthésie locale et légère sédation, sauf chez l'enfant dont l'examen est réalisé sous anesthésie générale. La technique, qui consiste à introduire un endoscope semi-rigide de petit diamètre dans les canaux salivaires, est assez délicate et nécessite un apprentissage avant d'être réalisée chez le patient. Le besoin d'avoir une salivation active durant la procédure nécessite d'avoir recours à des animaux vivants dont les canaux salivaires soient de taille suffisante pour introduire les endoscopes : Porcs adultes de sexe indifférent. Cette procédure non-invasive (aucune incision), qui durera 3 heures maximum au total, sera réalisée sous anesthésie générale. En absence de complications sévères liées au geste ou de complications anesthésiques, la douleur étant légère voire nulle, tous les animaux seront réveillés à la fin de la procédure et recevront un antalgique pendant 2 à 4 jours. Ils pourront ensuite être utilisés dans un autre projet de formation recourant à une procédure sans réveil. Il est prévu 1 animal/3 apprenants + 1 formateur (praticien). Il y aura environ 12 étudiants/an soit une estimation de 4 porcs/an, soit 20 porcs au total sur 5 ans. Cette formation s'adresse aux chirurgiens maxillo-faciaux et ORL.

1321- Le projet consiste à trouver de nouvelles molécules pour traiter la phénylcétonurie. Ce sont des produits agissant sur la phénylalanine hydroxylase (PAH), enzyme présente dans le foie, qui permet la transformation de la phénylalanine en tyrosine. Les personnes atteintes de phénylcétonurie ont un déficit en PAH. L'augmentation du taux de phénylalanine qui en résulte provoque des retards mentaux et de graves problèmes neurologiques irréversibles. Cette maladie du métabolisme est une maladie génétique de transmission autosomique récessive. Elle compte environ 500 mutations différentes codant pour une enzyme plus ou moins fonctionnelle entraînant une maladie plus ou moins grave. La phénylalanine étant un acide aminé essentiel (apporté exclusivement par l'alimentation), un régime strict réduisant son apport et un diagnostic précoce permet aux enfants un développement normal. Seulement, le régime doit se suivre à vie et peut être lourd pour les patients. Aujourd'hui le Kuvan est la seule alternative au régime, c'est un cofacteur synthétique de la PAH qui restaure sa fonction biologique. Néanmoins tous les patients ne sont pas sensibles à ce produit. Les nouveaux composés sont sélectionnés à partir de banques de molécules déjà connues et utilisées. Une première sélection se fait in silico où deux types de composés seront sélectionnés : les nouveaux composés ayant un spectre similaire au Kuvan et d'autres avec un spectre complémentaire au Kuvan. Ensuite des tests in vitro permettent de refaire une sélection des composés les plus prometteurs qui seront choisis pour des tests d'efficacité menés dans des modèles murins. Ces tests permettront de déterminer le degré d'efficacité des nouveaux composés, par rapport au médicament de référence le Kuvan. Ce projet contient donc une partie expérimentation animale essentielle afin de tester les effets de ces molécules in vivo. Les tests précliniques in vivo sont nécessaires avant de pouvoir effectuer les études cliniques sur l'homme. 56 souris seront utilisées pour ce projet. Le nombre de souris est réduit grâce aux études en amont (in silico et in vitro) qui permettent de réduire le nombre de molécules à tester et aux études statistiques qui permettent de réduire l'effectif des groupes. Les expérimentations pour ce projet sont peu invasives (classe modérée en degrés de sévérité), de courtes durées et des points limites sont définis afin de prévenir la souffrance et la détresse des animaux.

1322- L'impossibilité des axones à se régénérer est une cause majeure de détérioration neurologique suite à une lésion du système nerveux central (SNC) mais pas du système nerveux périphérique (SNP). En effet, une section du ganglion spinal fait perdre la sensibilité de la partie innervée. De façon remarquable, suite à une telle lésion, le SNP est capable de déclencher un programme génétique coordonné permettant l'expression de gènes de régénération axonale (RAGs) qui vont mener à la réinnervation fonctionnelle du muscle cible. Des travaux récents montrent que PCAF, une protéine de la famille des acétyltransférases (histone acetyltransferase p300/CBP-associated factor) permet l'induction de certains gènes-clés participant aux mécanismes de régénération suite à une axotomie du nerf sciatique chez la souris. De plus, la protéine PCAF est essentielle à ces mécanismes de régénération car ils ne se produisent pas chez la souris n'exprimant pas PCAF (PCAF KO). Dans ce projet, nous voulons apporter des précisions quant aux mécanismes moléculaires activés par PCAF, par comparaison des mécanismes mis en jeu dans les souris WT et les souris PCAF KO. La connaissance de ces mécanismes ouvrira sur des cibles thérapeutiques plus efficaces dans la régénération axonale et la récupération fonctionnelle, qui nous l'espérons, pourront être appliquées ensuite à des pathologies centrales telles que l'accident vasculaire cérébral (AVC), le trauma crânien ou les lésions de la moelle épinière. Dans la mesure où nos travaux portent sur la régénération axonale « in vivo » et leur dynamique, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, nous estimons le nombre d'animaux total à environ 60 souris homozygotes (PCAFKO) et 120 souris contrôle (WT) de même fratrie (mélange mâles/femelles).

Nous optimisons l'expérimentation (Raffinement) de plusieurs manières : 1/ les protocoles sont planifiés 2 à 3 semaines à l'avance de façon à éviter des perturbations susceptibles de stresser les animaux, de disposer des locaux et du matériel nécessaires pour réaliser la totalité de l'expérimentation, 2/ Des soins pré-, per- et postopératoires sont prodigués aux animaux opérés sous anesthésie.

1323- La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision. Aucun traitement n'est disponible à l'heure actuelle. Le but de notre étude est de pouvoir proposer une solution thérapeutique aux patients atteints de RP. L'équipe a identifié deux gènes *Nxn1* et *Nxn2* qui codent pour des facteurs qui seraient impliqués dans la survie des photorécepteurs à cônes, RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor » et RdCVF2. Nous testerons l'effet bénéfique de ces facteurs sur des modèles murins de rétinopathie pigmentaire. Au total 288 animaux seront nécessaires à cette étude (test des 2 facteurs, à différents dosages). Le bénéfice attendu sera évalué par des tests de la vision à l'aide d'électrorétinogramme (technique non invasive) suivi d'études histologiques et biochimiques de la rétine des animaux. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 «règle des 3R».

1324- Malgré les progrès thérapeutiques des vingt dernières années, le cancer bronchique primitif est une des principales causes de décès prématuré dans les pays développés. En France, le cancer bronchique est la première cause de mortalité par cancer.

Nous avons mis en place un modèle de cancer bronchique primitif non à petites cellules orthotopique chez la souris nude par d'injection intra-pulmonaire de cellules tumorales. Ce type de modèle permet d'obtenir des lots homogènes d'animaux porteurs de tumeurs qui sont nécessaires aux études précliniques. Ces lots permettront de tester l'efficacité des nouveaux vecteurs de médicaments anticancéreux issus de notre unité de recherche. L'évaluation de l'efficacité d'une formulation de nanocapsules lipidiques de paclitaxel sera réalisée par dosage du paclitaxel dans les tumeurs, par étude de la survie des animaux et étude de la fuite capillaire dans les tumeurs (effet EPR). Quarante animaux seront inclus dans ce protocole. Dans la mesure où il n'existe aucune méthode de remplacement pour réaliser les travaux présentés, nous avons réduit l'effectif de chaque analyse à l'effectif minimal pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et raffiner les analyses pour répondre aux questions posées par le protocole. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour répondre à questions scientifiques posées. La douleur et la souffrance des animaux sont réduites par l'emploi de traitements antalgiques avant, pendant et après l'induction du modèle tumoral. L'angoisse des animaux est réduite par un mode de vie en groupes perturbé uniquement par des temps de traitements et d'observation courts.

1325- Nous avons montré, par plusieurs 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.

L'inflammation est un processus naturel de défense mais qui peut être dérégulé dans de nombreuses pathologies et à l'origine de dommages importants. Contrairement à la plupart des anti-inflammatoires actuellement sur le marché qui sont également immuno-suppresseurs, le Gc3Tri n'induit pas d'immunosuppression et pourrait donc être utilisé dans des pathologies aussi diverses que les maladies infectieuses, les inflammations intestinales (maladie de Crohn ...), les maladies métaboliques.

Afin de déterminer quel(s) pourrai(en)t être le (les) domaine(s) d'utilisation du Gc3Tri, nous nous proposons de déterminer le mécanisme d'action de ce mannodendrimère. Les études sont basées sur des groupes de 7 souris adultes. 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 7, ceci afin

d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. Cette étude nécessitera 812 animaux de trois lignées de souris disponibles au laboratoire ou commercialement. Ce nombre pourra être réduit à 756 voir même 672 en fonction des résultats.

L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire), 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. Dans des études in vivo menées précédemment, dans lesquelles le mannodendrimère était administré par gavage, aucune toxicité du Gc3Tri, n'a été constatée pour des doses de 10 mg/kg. De plus, dans le modèle choisi, l'inflammation est induite par un composé bactérien, le LPS. Celui-ci est nébulisé dans une cage afin de ne pas avoir à placer les animaux dans un module de contention qui serait source d'angoisse. Ce modèle, bien caractérisé, est couramment utilisé dans de nombreux laboratoires. Elle n'induit pas de signes de douleurs manifestes pour les souris et est de courte durée (24 à 48h).

1326- Les glioblastomes sont les tumeurs intracrâniennes primaires les plus fréquentes. Ce sont également celles dont le pronostic est le plus sombre. En effet, même avec la prise en charge thérapeutique actuelle, moins de 10% des patients vivent plus de 5 après le diagnostic. Le schéma thérapeutique actuel associe l'exérèse chirurgicale, puis une radiochimiothérapie. L'agent de chimiothérapie, le Temodal, a permis le plus grand progrès des 30 dernières années en augmentant la médiane de survie d'environ 3-4 mois. Ceci démontre d'une part que la chimiothérapie peut contribuer significativement à la prise en charge des glioblastomes et que son application actuelle n'a pas une efficacité suffisante.

C'est pour cette raison que nous avons fait des travaux sur les mécanismes responsables de la résistance à ce traitement. Nous avons identifié sur des lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains 4 gènes dont l'expression renforce la capacité des cellules à survivre à la chimiothérapie. L'inhibition de leur expression concomitante à l'application du Temodal réduit la croissance cellulaire in vitro.

L'objectif de ce travail est de confirmer in vivo l'intérêt thérapeutique d'une telle stratégie.

Des tumeurs gliomateuses seront obtenues par la greffe de cellules humaines chez la souris Nude. Nous évaluerons l'inhibition de 4 gènes d'intérêt en comparaison d'une situation témoin, ce qui fait 5 groupes. Chaque groupe d'animaux comprendra 10 individus, nombre minimal nécessaire pour assurer un traitement statistique robuste, et l'expérience sera reproduite 3 fois, ce qui fait un total de 150 animaux.

Les animaux seront maintenus en milieu protégé, en rapport avec leur statut immunodéprimé, avec un accès à l'alimentation ad libitum. Une surveillance 3 fois par semaine sera réalisée pour évaluer la condition clinique des animaux et les tumeurs seront mesurées une fois par semaine. L'observation d'un seul des points limites entraînera l'euthanasie immédiate des animaux concernés.

1327- Nous avons montré, par plusieurs 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. L'inflammation est un processus naturel de défense mais qui peut être dérégulé dans de nombreuses pathologies et à l'origine de dommages importants. Contrairement à la plupart des anti-inflammatoires actuellement sur le marché qui sont également immuno-suppresseurs, le Gc3Tri n'induit pas d'immunosuppression et pourrait donc être utilisé dans des pathologies aussi diverses que les maladies infectieuses, les inflammations intestinales (maladie de Crohn ...), les maladies métaboliques. Afin de déterminer quel(s) pourrai(en)t être le (les) domaine(s) d'utilisation du Gc3Tri, nous nous proposons de déterminer le mécanisme d'action de ce mannodendrimère. Les études sont basées sur des groupes de 7 souris adultes. 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 7, ceci afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. Cette étude nécessitera 812 animaux de trois lignées de souris disponibles au laboratoire ou commercialement. Ce nombre pourra être réduit à 756 voir même 672 en fonction des résultats. L'état général des animaux (poil hérissé, hypo- ou hyperactivité...), la physiologie (rythme respiratoire), 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. Dans des études in vivo menées précédemment, dans lesquelles le mannodendrimère était administré par gavage, aucune toxicité du Gc3Tri, n'a été constatée pour des doses de 10 mg/kg. De plus, dans le modèle choisi, l'inflammation est induite par un composé bactérien, le LPS. Celui-ci est nébulisé dans une cage afin de ne pas avoir à placer les animaux dans un module de contention qui serait source d'angoisse. Ce modèle, bien caractérisé, est couramment utilisé dans de nombreux laboratoires. Elle n'induit pas de signes de douleurs manifestes pour les souris et est de courte durée (24 à 48h).

1328- Les glioblastomes sont les tumeurs intracrâniennes primaires les plus fréquentes. Ce sont également celles dont le pronostic est le plus sombre. En effet, même avec la prise en charge thérapeutique actuelle, moins de 10% des patients vivent plus de 5 après le diagnostic. Le schéma thérapeutique actuel associe l'exérèse chirurgicale, puis une radiochimiothérapie. L'agent de chimiothérapie, le Temodal, a permis le plus grand progrès des 30 dernières années en augmentant la médiane de survie d'environ 3-4 mois. Ceci démontre d'une part que la chimiothérapie peut contribuer significativement à

la prise en charge des glioblastomes et que son application actuelle n'a pas une efficacité suffisante. C'est pour cette raison que nous avons fait des travaux sur les mécanismes responsables de la résistance à ce traitement. Nous avons identifié sur des lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains 4 gènes dont l'expression renforce la capacité des cellules à survivre à la chimiothérapie. L'inhibition de leur expression concomitante à l'application du Temodal réduit la croissance cellulaire in vitro. L'objectif de ce travail est de confirmer in vivo l'intérêt thérapeutique d'une telle stratégie. Des tumeurs gliomateuses seront obtenues par la greffe de cellules humaines chez la souris Nude. Nous évaluerons l'inhibition de 4 gènes d'intérêt en comparaison d'une situation témoin, ce qui fait 5 groupes. Chaque groupe d'animaux comprendra 10 individus, nombre minimal nécessaire pour assurer un traitement statistique robuste, et l'expérience sera reproduite 3 fois, ce qui fait un total de 150 animaux. Les animaux seront maintenus en milieu protégé, en rapport avec leur statut immunodéprimé, avec un accès à l'alimentation ad libitum. Une surveillance 3 fois par semaine sera réalisée pour évaluer la condition clinique des animaux et les tumeurs seront mesurées une fois par semaine. L'observation d'un seul des points limites entraînera l'euthanasie immédiate des animaux concernés.

1329- Le tube digestif héberge une communauté microbienne complexe, le microbiote intestinal, dont les capacités métaboliques sont plus riches et diversifiées que celles codées par le génome de l'hôte. Le microbiote intestinal a un impact majeur sur le métabolisme de l'organisme. Il métabolise notamment le tryptophane en indole, qui est ensuite transformé dans le foie en dérivés oxydés, les oxindoles (isatine, oxindole, 5-OH-oxindole). Les oxindoles sont des molécules neuroactives : ils possèdent des sites de liaison cérébraux, sont anxiogènes à faible dose et sédatifs à forte dose chez le rat, et l'augmentation de leur taux sanguin chez l'Homme est associée à plusieurs pathologies neuropsychiatriques (ex : encéphalopathie hépatique). Le projet aura pour objet d'étudier si une augmentation de la production bactérienne d'indole dans la lumière intestinale, consécutive à des déséquilibres du microbiote, peut augmenter le pool circulant d'oxindoles et induire un dysfonctionnement cérébral.

Les travaux seront menés avec des modèles de souris porteuses de microbiotes intestinaux exprimant différents niveaux de production d'indole. Nous en étudierons l'impact sur des comportements de type anxieux (tests de nouveauté, de « step-down », d'enfouissement des billes) et dépressif (tests d'évaluation du pelage, de résignation), nous évaluerons la réaction neuro-endocrine au stress et nous mesurerons des marqueurs d'inflammation. Ce projet s'inscrit dans un champ thématique en plein essor, à savoir l'étude de l'influence du microbiote intestinal sur le développement et le fonctionnement cérébral. Les quelques travaux publiés à ce jour, dont les nôtres rapportent un effet de la présence du microbiote sur la réaction au stress. Cependant, des variations de résultats existent selon le modèle animal et le test comportemental utilisés, et aucun mécanisme d'action n'a encore été proposé. Le projet, portant sur la relation entre l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Nous devons utiliser des souris sans-germe (axéniques) qui seront inoculées à l'âge adulte avec des bactéries exprimant différents niveaux de production d'indole. Le nombre de souris (153) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats. Aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude, du fait de la faible invasivité du protocole. Les souris seront 6 par cage pour maintenir leur sociabilité. Dans chaque cage le milieu sera enrichi par l'apport d'essuie-tout (pour faire un nid) et d'un bâton de bois à ronger. L'état de santé et de bien-être des animaux sera surveillé quotidiennement.

1330- Les maladies de l'oreille interne causent des déficits fonctionnels persistants, des handicaps liés à la perte auditive (problème de communication), des pertes d'équilibre ou encore des défauts de posture. Ces pathologies incluent : les névrites vestibulaires, les vertiges migraineux, la surdité soudaine neurosensorielle idiopathique (SSNI), la perte auditive suite à un traumatisme (sonore, trauma crânien). Bien que ces déficits vestibulaires durables puissent être, dans une certaine mesure, compensés ou masqués dans la vie de tous les jours, les patients souffrent de problèmes permanents d'équilibre ou d'étourdissement et de handicaps qui augmentent le risque de chutes et s'accroissent avec l'âge. Actuellement, aucun traitement ciblé et efficace n'est disponible pour les patients souffrant de telles atteintes de l'oreille interne. Nous travaillons à l'identification et au développement de nouveaux traitements ciblés pour satisfaire ce besoin médical mal connu bien qu'il ait de nombreuses implications en santé publique. Des études sont en cours pour répondre aux demandes des autorités de régulation liées au développement d'un composé de première génération déjà identifiés mais aussi à celles liées à un composé de seconde génération ayant une efficacité plus élevée et moins d'effets secondaires. Après avoir été testés dans des études in vitro, il est nécessaire que ces composés démontrent efficacité et sécurité in vivo avant passage chez l'homme. La capacité des candidats-médicaments à atteindre les cibles dans l'oreille interne et traiter les symptômes des déficits vestibulaires ne peut être évaluée que chez l'animal avec un système vestibulaire complet, capable de reproduire le fonctionnement et les symptômes observés chez le patient. De plus, pour soutenir le développement translationnel d'un candidat-médicament, il est nécessaire de bien établir la relation PK/PD entre les doses efficaces. C'est pourquoi ce projet inclut 2 procédures : l'une permet de tester l'efficacité des candidats-médicaments sur un modèle pathologique chez le rat, l'autre permet d'étudier la pharmacocinétique des candidats-médicaments chez le rat également. Il couvre l'utilisation d'au maximum 17580 rats Long-Evans sur 5 ans. 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 : Spécifiquement, une analyse en biostatistiques est réalisée afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et de réduire le nombre d'animaux utilisés, l'utilisation systématique d'anesthésiques, d'antalgiques et de système de contention doux et approprié (moins de stress pour l'animal) lié

à un protocole d'habituation, tous ces éléments assure l'application maximale du principe des 3R. Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact à l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

1331- Dans le cadre du plan protéine 2014/2020 mis en place par le ministère en charge de l'agriculture, plusieurs projets de recherche ont été construits. Ces projets visent à améliorer l'autonomie de la France et à développer une production nationale de produits traçés et non OGM à substituer au tourteau de Soja, dont 3.5 millions de tonnes (majoritairement OGM) sont importées chaque année. Les volailles représentent le plus gros débouché du tourteau de Soja et par conséquent un potentiel intéressant pour ces nouvelles matières premières, essentiellement à base de graines oléoprotéagineuses. Cependant une teneur en protéine et une digestibilité inférieures à celle du Soja, ainsi que la présence de facteurs antinutritionnels limitent leur utilisation dans l'alimentation des volailles. Leur valorisation par les animaux passe donc par une amélioration de la valeur nutritionnelle, qui peut être obtenue par la sélection variétale mais avec un pas de temps long ou par la technologie. Cette voie plus rapide combine des procédés anciens mais de plus en plus performants comme le dépelliculage, la germination et l'extrusion et des procédés nouveaux comme le microbroyage ou la fermentation enzymatique en milieu solide. L'évaluation de la valeur nutritionnelle et de la réponse animale chez les espèces cibles est l'objet de ce projet, la méthode des bilans digestifs chez le poulet étant la référence. Au cours des 5 années du projet, en regroupant différents programmes de recherche, nous prévoyons de réaliser au maximum 10 séries de bilans (1 série correspondant à 120 bilans), soit au maximum 1800 animaux. Le remplacement n'est pas possible car il n'existe à ce jour aucune technique in vitro pour apprécier la valeur nutritionnelle des aliments par espèce. La réduction est prise en compte : le nombre d'animaux est limité au minimum statistique requis, des techniques in vitro seront utilisées en amont pour faire un premier tri des matières premières d'intérêt et en parallèle (spectrométrie infrarouge) pour constituer une base de données et limiter, si possible éviter, le recours à l'animal dans le futur. Le raffinement consiste d'une part à réduire le temps de séjour en cages à bilan des animaux (3 jours d'adaptation et 3 jours de bilan), en travaillant sur des régimes alimentaires aussi équilibrés que possible pour éviter les dérèglements digestifs, en réalisant les bilans à 3 semaines d'âge, et dans des cages grillagées sur les 4 côtés permettant le plus possible aux animaux de se voir et d'échanger. Par ailleurs en groupant pour des séries importantes plusieurs programmes de recherche, le nombre de témoins est réduit et il est possible de relier les matières premières entre elles sans expérimentation supplémentaire, ce qui améliore la robustesse des tables d'alimentation.

1332- Les gamètes (ovocytes et spermatozoïdes) sont issus de la différenciation des cellules germinales au sein des gonades. Cette différenciation, qui débute pendant la vie fœtale et se termine à la puberté, est le fruit de l'activité d'une cascade de nombreux gènes. Chez l'humain, des corrélations ont pu être établies entre des aberrations de la différenciation gonadique et des mutations géniques. De nombreux travaux ont déjà été effectués en utilisant la souris comme animal modèle pour mieux comprendre ces relations entre phénotype et génotype. Cependant, la souris est un animal très particulier dans le groupe des mammifères en ce qui concerne l'étude de la différenciation sexuelle. En effet, on constate que les études de génomique fonctionnelle chez la souris ne reproduisent pas toujours les phénotypes observés chez de nombreux autres mammifères. Il est donc indispensable d'effectuer des études de génomique fonctionnelle complémentaires chez une autre espèce de mammifère que la souris. Le projet vise à identifier le rôle d'un gène, le gène DMRT, sur la différenciation gonadique chez le lapin. Chez l'humain, une mutation dans ce gène est associée à une perturbation de la différenciation sexuelle, avec présence d'une gonade de type femelle chez les individus génétiquement males dès la naissance. Chez la souris, l'invalidation de ce gène ne provoque pas ces perturbations à la naissance. L'invalidation de ce gène a donc été entreprise chez une autre espèce, le lapin, car de nombreuses données montrent que cette espèce est un modèle plus proche de l'homme et des autres mammifères que la souris en ce qui concerne l'étude des mécanismes à l'origine de la différenciation des gonades. Pour invalider le fonctionnement du gène étudié, les lapins seront génétiquement modifiés par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase (injection sous forme d'ARN ou de protéine) qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations (délétions ou insertions) à l'origine de l'invalidation du fonctionnement du gène. L'expérimentation comprend deux procédures expérimentales :

1) - la production des animaux fondateurs F0 génétiquement modifiés; ceci implique:

- la saillie de lapines ayant reçu un traitement hormonal de superovulation,
- la récupération des embryons unicellulaires suite à l'euthanasie des lapines, et l'injection de l'enzyme de modification,
- leur transfert dans les voies génitales d'une lapine receveuse,
- l'élevage des petits après leur naissance, l'analyse de leur génotype, la caractérisation des petits chez lesquels le gène DMRT1 est génétiquement modifié

2) - l'analyse du phénotype déterminé par l'invalidation du gène; ceci consiste à amplifier le nombre d'animaux de génotype intéressant par croisements, puis à analyser leur phénotype.

Le protocole prévoit d'utiliser 50 lapines adultes, 54 jeunes lapins (de la naissance à 5 mois), et 60 fœtus. Les travaux sont toujours effectués pour essayer d'atteindre les objectifs en utilisant le plus petit nombre d'animaux possible: pour cela, il est prévu d'effectuer la procédure n°1 plusieurs fois en utilisant à chaque fois un petit effectif d'animaux, et en analysant rapidement les résultats. Dès que le nombre d'animaux fondateurs F0 désiré est atteint, la procédure n°1 n'est plus effectuée et la procédure n°2 est engagée. Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées sont réduites au maximum, par anesthésie et médication contre la douleur lors des opérations chirurgicales, et par des pratiques d'élevage appropriées. Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

1333- Le développement de la glande mammaire joue un rôle important sur la production laitière. A chaque cycle de reproduction, la glande mammaire passe par différentes phases où les cellules se multiplient, puis se spécialisent et se préparent à produire et sécréter le lait. Des gènes clefs gouvernent ces différentes étapes. Nous avons montré que le gène Rspodin 1 (Rspo1) est indispensable au développement de la glande mammaire et à la mise en place de la production de lait chez la souris. Nous souhaitons maintenant comprendre à quels moments la protéine Rspo1 agit et quel est son rôle lors des transformations mammaires pendant les cycles de reproduction. Pour cela nous allons utiliser trois modèles de souris qui permettent la surexpression, à des niveaux différents, de cette protéine dans la glande mammaire à ces différents moments du cycle de reproduction. De plus, nous analyserons si cette protéine peut provoquer le développement de tumeurs mammaires. Afin de réduire le nombre de femelles utilisées pour ce protocole, chaque individu fera l'objet de prélèvements mammaires à deux stades physiologiques. Seules deux glandes mammaires sur les dix présentes seront prélevées, ce protocole permet à la souris de poursuivre l'allaitement de ces petits normalement. Ensuite le développement de tumeur mammaire sera étudié sur ces mêmes animaux. Le nombre d'animaux est réduit à 5 par condition expérimentale, ce chiffre permettant d'obtenir des données suffisantes pour réaliser une analyse à l'aide de tests non paramétriques et prendre en compte les variabilités individuelles. Le projet nécessite l'utilisation de 150 souris femelles et 30 souris mâles. Lors des opérations, les animaux seront anesthésiés après avoir reçu un antalgique qui agira pendant et après l'opération. Après l'opération, le bien-être des animaux sera évalué grâce à une grille de notation de la douleur. Si les animaux présentent des signes de douleur, des injections d'antalgique seront réalisées. Si la douleur reste trop forte les animaux seront euthanasiés. Ce protocole permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés grâce à la possibilité d'utiliser une même souris pour étudier deux stades, puis le développement de tumeurs mammaires. Tous les animaux utilisés pour cette expérimentation proviennent d'élevage reconnu et sont nés en captivité. Quand les animaux seront hébergés seuls dans leur cage (en période de fin de gestation et lors de la mise bas), un enrichissement de leur environnement (ouate de cellulose) sera réalisé. Aucune alternative à nos procédures expérimentales, tel que l'utilisation de culture cellulaire, n'est possible puisque nous étudions le développement d'un organe au niveau de l'animal entier à des stades physiologiques particuliers, comme la gestation. Les résultats obtenus lors de ce projet permettront de mieux comprendre la biologie de la glande mammaire, d'évaluer si la protéine Rspo1 a un rôle permettant d'expliquer des différences de production de lait suivant les individus, et un rôle dans le développement de tumeurs mammaires.

1334- Ce protocole permet d'évaluer l'impact de l'inhibition d'un ARN ou d'une protéine sur le potentiel métastatique (étapes tardives d'extravasation et de colonisation des organes à distance) de la lignée de carcinome mammaire murin 4T1 après injection dans la veine caudale de souris syngéniques.

Afin de respecter la règle des 3R, ces expériences sont réalisées avec une lignée cellulaire exprimant la luciférase pour Réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, l'imagerie permet de suivre le développement de métastases au cours du temps sur les mêmes animaux maintenus en vie tout le temps de l'expérience plutôt que de sacrifier des groupes d'animaux à différents temps au cours de l'expérience. Ainsi, des lots de 20 souris par expérience sont suffisants à raison de 10 souris par condition, 2 conditions étant comparées : la condition des cellules cancéreuses traitées par oligonucléotide antisens comparée à la condition contrôle (mock-transfectée). Pour chaque ARN ou protéine ciblée, le résultat d'une première expérience sera confirmée par une deuxième expérience indépendante réalisée dans les mêmes conditions. Une troisième expérience sera nécessaire si les 2 premières expériences ne permettent pas de conclure. Les travaux de l'équipe sur l'implication des modifications post-transcriptionnelles dans le processus métastatique permettent d'identifier un nouvel acteur (nouvelle cible thérapeutique potentielle) par an. Chaque année, 60 souris (20 souris x 3 répétitions au maximum) seront donc nécessaires à la réalisation de ce projet soit 300 souris en tout sur la période de 5 ans. Dans un souci de raffinement, la procédure expérimentale employée dans ce projet est peu invasive et peu douloureuse. L'imagerie bioluminescente étant une technique sensible (plus sensible que l'observation macroscopique des organes disséqués), les animaux sont maintenus en vie un temps court (1 mois environ) et sacrifiés avant l'apparition de signes de souffrance respiratoire liés au développement de métastases pulmonaires.

Dans un souci de remplacement, dans ce projet les étapes précoces du processus métastatique sont étudiées in vitro par des tests d'invasion à travers du matrigel. En revanche, il n'existe malheureusement pas d'alternative expérimentale in vitro pour l'étude des étapes tardives d'extravasation et de colonisation des organes à distance qui font l'objet de cette demande d'autorisation.

1335- Les plaquettes jouent un rôle primordial de protection de l'intégrité vasculaire, et donc contre les hémorragies. L'interleukine 21, ou IL-21, régule de nombreux processus immunologiques. Des essais cliniques d'administration de cette protéine chez l'homme montre un effet indésirable, qui se manifeste par une diminution du nombre de plaquettes sanguines. Pourtant, les expériences in vitro indiquent que l'IL-21 favorise l'expansion des mégacaryocytes, des cellules de la moelle aussi présentes dans la rate et, impliquées dans le remplacement des plaquettes. La littérature montre que chez la souris, l'IL-21 peut entraîner une splénomégalie, un organe par ailleurs réputé pour capturer et/ou retenir les plaquettes. Par ailleurs, l'IL-21 agit sur les macrophages, des cellules localisées dans la rate et le foie, impliquées dans l'élimination des plaquettes circulantes.

Le but de ce projet est de vérifier que la rate est directement impliquée dans la baisse de la quantité de plaquettes sanguines occasionnée par l'IL-21. Il s'agira de comparer des animaux à qui la rate aura été enlevée à des animaux qui auront suivi une procédure chirurgicale semblable mais sans aller jusqu'à la splénectomie. Après une semaine de récupération, les animaux recevront par injection hydrodynamique un vecteur d'expression vide, ou exprimant l'IL-21 murine. Les plaquettes

sanguines seront suivies par prélèvement sanguin pendant les jours qui suivent, puis les animaux seront sacrifiés pour réaliser des analyses cytologiques. Selon les résultats, des expériences complémentaires de déplétion de macrophages pourront être réalisées. Réduction du nombre d'animaux. Les expériences seront réalisées en minimisant autant qu'il en est possible le nombre d'animaux par condition expérimentale, pratiquement 6. Les expériences seront réalisées dans l'optique de déduire le maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés pour analyser leurs paramètres biologiques.

Raffinement. Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales, excepté pour l'infection hydrodynamique qui nécessite une circulation sanguine normale. D'après la littérature, la splénomégalie induite par l'IL-21 se développe en 5 à 7 jours, nous pensons donc pouvoir réaliser les expériences dans laps de temps, à la suite de quoi les animaux seront sacrifiés. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort. L'expérimentation sera arrêtée pour les animaux manifestant une souffrance au-delà d'un seuil préétabli.

Le nombre d'animaux prévus est de : 72 ou 216 souris, selon que les expériences complémentaires de déplétion des macrophages ne seront pas, ou seront réalisées.

1336- Notre objectif est de développer des test de détection de la protéine Shadoo de souris. Pour cela, nous avons besoin de développer des anticorps contre cette protéine. 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. 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 région immunogène de la protéine injectée 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 peptide antigénique dans le présent projet, soit 9 animaux au total. La production d'anticorps sera effectuée chez la chèvre âgée d'au moins six mois dont le poids (50 à 70 k) 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 d'un élevage caprin. Les antigènes sont des peptides de synthèse (deux peptides utilisés dans ce projet) ou la protéine entière. Ils sont administrés par injection sous cutanée 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. Ces animaux seront suivis par le personnel animalier et, dans le cas peu probable d'une apparition de douleur et/ou de réaction cutanée suite à ces injections, pris en charge par le vétérinaire référent. 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.

1337- Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont démontré chez la souris que l'efficacité anti-tumorale du cyclophosphamide est diminuée en absence de flore intestinale (après traitement antibiotique ou chez des souris dites axéniques, dépourvues de flore) et qu'une dysbiose (déséquilibre de la flore intestinale) est induite. Des données similaires concernant la chimiothérapie, oxaliplatine ainsi que l'immunothérapie CpG + anti-IL-10R ont également été publiées. De plus, chez les patients atteints de cancer de nombreux facteurs concourent à l'installation d'une dysbiose, comme la toxicité des chimiothérapies sur les muqueuses, la prescription d'antibiotiques pendant la neutropénie ou les corticoïdes entraînant l'anergie lymphocytaire. Actuellement, nous cherchons à mieux caractériser les dysbioses liées à la pathologie cancéreuse et en particulier lors de la carcinogenèse mammaire (modèle développé chez la souris) afin d'établir un lien dans ce processus entre métabolisme, immunité intestinale et immunité systémique. A terme, ce type d'études permettra de concevoir des thérapies de type probiotique permettant d'améliorer les réponses aux traitements anti-cancéreux. Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité anti-tumorale et la carcinogenèse mammaire induite par MPA/DMBA, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire in vitro ou ex vivo. Par ailleurs, le modèle de carcinogenèse étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude. Durant ce projet, 720 souris seront utilisées pendant la période décrite de 2 ans. Ce nombre se justifie par les différentes combinaisons antibiotiques étudiés durant cette étude et l'étendue de la diversité de la flore intestinale. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentateurs. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux par dislocation cervicale.

1338- L'anti PD-1 a démontré son efficacité clinique dans plusieurs pathologies oncologiques tels que le mélanome, le cancer pulmonaire non à petites cellules ou encore le cancer rénal. Néanmoins, ces thérapies ont un coût important et ne sont efficaces que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver des marqueurs prédictifs de réponse et les mécanismes cellulaires sous-jacents afin de proposer ultérieurement de nouvelles combinaisons thérapeutiques. Nous savons que cet anticorps monoclonal, de par sa cible, permet une réinduction de la réponse immune qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses mais nous ignorons encore les voies cellulaires et moléculaires essentielles pour son efficacité thérapeutique. Dans cet objectif, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de cet anticorps thérapeutique afin d'accroître son efficacité. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité et l'effet des thérapies et combinaisons thérapeutiques sur la réponse anti-tumorale avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire in vitro ou ex vivo. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentations. Le projet nécessitera 220 souris pour 12 mois. Ce nombre d'animaux se justifie par la diversité des modèles de tumeurs et les différentes voies de signalisation étudiées. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux par dislocation cervicale.

1339- L'exposition à la nicotine pendant la grossesse affecte le développement du cerveau au niveau de deux de ses principaux systèmes liés notamment au stress, à la dépression et au système de récompense. Des extraits de tabac et des extraits de fumée contenant tous les composants du tabac et de la fumée pourraient être plus intéressants que la nicotine seule pour étudier les effets comportementaux induits par le tabagisme. Pour étudier ces conséquences nous utiliserons des rattes gestantes auxquelles nous administrerons durant la gestation soit du sérum physiologique, soit de la nicotine, soit des extraits de tabac ou de fumée de cigarette. Nous étudierons ensuite chez les rats nés de ces mères l'activité des neurones par électrophysiologie, sous anesthésie, à l'adolescence (7 semaines) et à l'âge adulte (14 semaines). Nous comptons reproduire une situation analogue à celle des enfants dont la mère a consommé du tabac durant la grossesse. L'effet d'une exposition prénatale au tabac chez le petit ne peut-être actuellement étudiée qu'en soumettant la femelle à ce produit durant la gestation et en étudiant le fonctionnement du cerveau d'un animal s'étant développé dans ces conditions, à l'âge adulte. Nous avons choisi d'utiliser des rats car leur système nerveux central est bien connu et présente des similitudes de fonctionnement avec l'homme; ces animaux représentent donc un bon modèle d'étude pour l'homme. De plus, le rat est prolifique et chaque ratte permet d'obtenir une dizaine de petits au terme d'une gestation courte. La gestation de 21 jours nous permet d'effectuer aisément un traitement prénatal prolongé. La gestation de rattes n'étant que de 21 jours, la durée du traitement prénatal est donc aussi relativement courte. Nous réduisons à sa valeur nécessaire le nombre d'animaux utilisés en effectuant un calcul prévisionnel statistique de puissance. Le nombre maximum de rattes gestantes que nous prévoyons d'utiliser est de 44. Le nombre de rats utilisés sera de 320. Nous serons très attentifs aux conditions d'hébergement des animaux et à leur état de santé. Pour prévenir la douleur nous utilisons un protocole d'anesthésie et d'analgésie adapté à chaque étape de l'expérimentation.

1340- Une baisse de fertilité a été enregistrée depuis 10 ans au sein des élevages bovins laitiers. Or la gestation et la mise-bas sont indispensables au déclenchement naturel de la sécrétion lactée chez la vache comme chez tous les mammifères. Ainsi l'infertilité de la vache laitière est la principale cause de réforme. L'établissement et le déroulement de la gestation chez les mammifères reposent sur une série d'interactions complexes entre l'organisme maternel et les gamètes, l'embryon puis le fœtus. Ces processus s'appuient sur l'enchaînement de mécanismes développementaux mettant en jeu l'expression de nombreux gènes. De multiples régulations s'installent entre l'organisme maternel et l'embryon. Elles constituent les bases du « dialogue mère-embryon ». Ces échanges s'installent très précocement dès la fécondation. Ces relations s'intensifient lors du passage de l'embryon dans l'utérus au moment de la période péri-implantatoire. Les recherches menées jusqu'à ce jour ont contribué à identifier les bases moléculaires de ces interactions à différents stades de développement de la gestation chez les ruminants. Les projets actuellement poursuivis examinent le rôle de plusieurs classes moléculaires dans ces mécanismes ainsi que les conséquences de l'activité des gènes identifiés. L'objectif des programmes de recherche est d'étendre le recensement des facteurs de l'environnement de l'ovocyte, de l'embryon puis du conceptus et de comprendre les régulations qu'ils mettent en œuvre. Ces études sont essentielles car les connaissances actuelles montrent qu'une part importante de la mortalité embryonnaire a pour origine un défaut des mécanismes liés à ces interactions mère-embryon. De manière générale, les conditions d'élevage influencent très directement les éléments du micro-environnement de l'embryon. L'impact des conduites alimentaires a été démontré. Aujourd'hui et dans l'avenir, on peut s'attendre à ce que l'évolution des conduites d'élevage du fait d'objectifs économiques ou de considérations environnementales (climatiques) auront un impact sur la fertilité qu'il est important d'essayer de comprendre pour anticiper, voire de prévenir des évolutions non souhaitables. Ces arguments plaident en faveur d'un approfondissement des programmes scientifiques cherchant à connaître la nature des relations entre la mère et l'embryon au début de la gestation. La partie principale du présent projet envisage de collecter plusieurs séries d'échantillons biologiques chez l'animal vigile de l'espèce bovine à plusieurs stades de sa période

reproductive. Les prélèvements d'ovocytes et d'embryon s'effectueront selon des méthodes utilisées en routine dans les élevages sur 225 vaches maintenues vivantes après l'expérimentation. Des prélèvements de tissus utérins sont effectués au moyen de pince à biopsies par passage par les voies naturelles (vagin, col de l'utérus). Enfin des prélèvements de sang sont effectués pour évaluer les concentrations des principaux facteurs métaboliques et hormonaux. La seconde partie du projet prévoit le prélèvement de tissus maternels (utérus, ovaire), embryonnaires et fœtaux à des stades plus avancées de la gestation sur 100 animaux après abattage. Dans ce cas les animaux seront choisis parmi les vaches en fin de carrière. Après synchronisation de leur cycle sexuel, elles seront inséminées de manière identique à ce qui est effectué dans la première partie du projet et seront sacrifiées dans les abattoirs commerciaux ou expérimentaux où les tissus seront récoltés. Les prises de sang, la pose d'implant, les injections et leurs effets ainsi que l'insémination sont des procédures utilisées en routine dans les élevages et n'induisant pas de douleurs. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. La plupart de ces méthodes sont utilisées en routine dans les élevages en production. De plus elles sont largement maîtrisées dans l'unité expérimentale siège de leur mise au point.

1341- La molécule S est un nouveau type de molécule qui induit une inhibition de 3 grandes voies de signalisation cellulaire. L'activation de ces voies de signalisation est connue pour être impliquée dans la prolifération tumorale et le processus métastatique. La radiothérapie est un traitement standard qui est indiquée dans plus de 50% des cas de cancer. Cependant, son efficacité est parfois moins importante que celle souhaitée et la maladie finit par progresser à nouveau. Pour introduire de nouvelles molécules dans les protocoles cliniques, il est courant de les administrer en parallèle de protocoles standards. Par ailleurs, les voies de signalisation affectées par la molécule S semblent être également modulées par l'irradiation. Ainsi, il est probable que la molécule S administrée en combinaison avec les standards de traitement actuels pour les tumeurs cérébrales et pulmonaires qui incluent la radiothérapie améliore l'efficacité de ces traitements. Le recours à des modèles animaux nous permettra d'évaluer les effets de nouvelles combinaisons thérapeutiques dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et qui permet donc l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement naturel. Etant donné le mécanisme d'action connu de la molécule S et sachant que la réponse à la radiothérapie dépend de l'environnement tumoral, il apparaît indispensable d'avoir une évaluation sur un modèle animal pour déterminer exactement les effets de ces nouvelles combinaisons thérapeutiques avant un passage en thérapie humaine. Aucun modèle in vitro ne permet actuellement d'obtenir la complexité présente dans un animal vivant (vascularisation, organo-dépendance,...). Des souris immunodéficientes seront utilisées pour établir au mieux l'action des combinaisons thérapeutiques directement sur des tumeurs humaines. Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapie humaine de la molécule S, 600 souris seront nécessaires. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude. Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Les souris seront hébergées en cages avec 5 souris par cage dans le respect d'un cycle jour-nuit, avec une interdiction de manipuler les souris entre 19h30 et 7h30. Un enrichissement (boulettes de coton) sera introduit dans les cages du début à la fin de l'expérimentation.

1342- Le marché mondial des adjuvants de vaccins est en progression depuis de nombreuses années. En effet, si leur intérêt a été démontré depuis plusieurs décennies, une meilleure efficacité et une meilleure tolérance sont sans cesse recherchées. Avant d'être commercialisés, les adjuvants doivent être évalués sur le plan immunitaire. L'expérimentation sur souris est la première étape et constitue un modèle incontournable pour le criblage de nouveaux produits. Ce modèle est également pertinent car beaucoup de kits et de réactifs sont développés en immunologie, ce qui facilite grandement les investigations. L'évaluation de l'immunité des adjuvants repose sur l'utilisation d'un vaccin contenant un antigène neutre : l'ovalbumine. L'innocuité sera appréciée par l'observation des réactions locales (dépôts, granulômes, nécroses) au site d'injection. Lorsque ces dernières seront trop importantes, les animaux concernés seront directement euthanasiés. Le cobaye sera également utilisé sur vaccin placebo afin d'observer de manière plus précise via des coupes de muscles, l'innocuité des formulations pour des adjuvants proches d'être commercialisés. L'évaluation de l'efficacité du vaccin, sera réalisée par un suivi sérologique des anticorps et par l'identification après euthanasie des souris, des acteurs cellulaires et humoraux issus d'organes lymphoïdes (rate, ganglions...). L'analyse de ces paramètres sont confrontées à 2 lots témoins : antigène seul et adjuvant de référence. L'adjuvant de référence est un gold standard dont on connaît l'innocuité et l'efficacité. Il a 2 intérêts majeurs :

- son profil d'innocuité est bien définie et il est très bien toléré et n'engendre pas de réaction locale importante de type nécrose. Il permet ainsi de définir le niveau de sensibilité des souris face à l'injection. Des dérives sur le plan de l'innocuité, sur un lot de souris OF1, ont déjà été observées dans le passé après injection avec cet adjuvant de référence, par l'observation de réactions locales inhabituelles. Dans ce cadre, il nous sert de témoin contrôle vis à vis des formulations testées.
- au niveau de l'efficacité, cet adjuvant génère de forts titres anticorps IgG1 et IgG2a anti-OVA chez la souris. Au même titre que l'innocuité, ceci nous permet d'identifier les écarts sur des lots de souris mais surtout de positionner les nouvelles formules testées au regard des performances de cet adjuvant de référence. La règle des 3 R sera appliquée :
- Remplacement : Au sein de ce projet, l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales est nécessaire. Il n'existe en effet pas d'alternative suffisamment prédictive, dans la mesure où le système immunitaire est complexe et fait intervenir de nombreux organes et acteurs cellulaires et/ou humoraux. Les modèles in vitro existants ne permettent pas d'apporter une vision globale de la réponse immunitaire induite.
- Réduction : Le nombre d'animaux sera réduit au maximum mais il doit être cependant suffisant afin d'avoir une bonne représentabilité pour l'exploitation des données générées. Les groupes seront constitués de 5 souris

- Raffinement : Les vaccinations sont indolores et réalisées avec des aiguilles stériles très fines. Le site d'injection est systématiquement désinfecté à l'alcool avant la piqure. Les prélèvements sanguins au sinus rétro orbitaire est la méthode la moins invasive permettant la collecte de volume de sang suffisant. Les prises de sang sont suffisamment bien espacées dans le temps afin de ne pas trop manipuler les animaux et obtenir une cinétique d'anticorps spécifiques à court, moyen et long termes. Dans le cas où des réactions locales excessives et inacceptables apparaîtraient après vaccination, les animaux seront euthanasiés par CO₂. Sur les 5 années, un maximum de 2750 souris et 30 cobayes sera utilisé dans ce projet.

1343- Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et tumeurs concernent de nombreuses interventions orthopédiques. Ces défauts de grande taille peuvent requérir la mise en place d'une greffe osseuse provenant du patient ou d'un donneur, qui présentent des problèmes de disponibilité et/ou de qualité de l'os prélevé. L'ingénierie tissulaire osseuse, qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules capables de produire de la matrice osseuse, est une alternative prometteuse. Un procédé innovant de fabrication directe par fusion laser permet maintenant de fabriquer des implants à base d'hydroxyapatite, composé minéral équivalent à celui de la matrice osseuse, ayant une architecture «à façon». L'objectif de ce projet est d'utiliser ces implants de nouvelle génération pour : (1) Mieux comprendre l'origine des cellules impliquées dans la réparation osseuse: grâce à différentes architectures d'implant la contribution des différents tissus environnants sera évaluée indépendamment; (2) Optimiser la macroarchitecture de l'implant pour améliorer la régénération osseuse par ingénierie tissulaire: différentes architectures de pores seront testées pour leur capacité à supporter le potentiel réparateur de cellules souches adultes. Pour cette étude un modèle de défaut osseux fémoral (ostectomie diaphysaire) chez le rat Lewis sera utilisé, une technique d'évaluation de la formation osseuse reconnue et validée dans la littérature. Cependant, les études publiées concernent un défaut de taille critique (ne réparant pas spontanément) alors que l'étape 1 requiert un défaut capable de réparer. Ce projet inclut donc une phase de pré-expérimentation pour déterminer la taille maximum non critique d'un défaut osseux dans le fémur de rat. 3 tailles seront testées (3 rats/taille), soit 9 rats. Pour l'étude (1), des implants seront produits pour empêcher la diffusion cellulaire et moléculaire ou la diffusion cellulaire seule à partir des différents tissus impliqués dans la réparation osseuse et implantés dans un défaut non critique (déterminé par la pré-expérimentation) pour 8 semaines. 7 groupes seront testés pour la contribution cellulaire ou moléculaire de la moelle osseuse, du périoste, et du tissu osseux (8 rats/groupes), soit 56 rats. Pour l'étude (2), nous allons évaluer l'impact de la macroarchitecture sur la formation osseuse. Pour cela les implants seront chargés en cellules souches mésenchymateuses de rat puis implantés dans un défaut de taille critique (5 mm) pendant 12 semaines. 4 types de macroarchitecture (porosité giroïde, ovale, carrée, fractale) seront testés (8 rats/groupes), soit 32 rats.

Total des animaux : 97 Il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité des tissus impliqués dans la réparation osseuse. Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasives (microscanner et bioluminescence) seront utilisées pour suivre la formation osseuse et la survie cellulaire sur le même animal. Les animaux ne seront mis à mort qu'au temps terminal de l'étude. La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Pour chaque analyse in vivo, les rats seront anesthésiés. Au cas où des douleurs persistent malgré les traitements entrepris ou d'infection majeure, l'animal sera mis à mort.

1344- Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur la mise en place des mécanismes d'homéostasie lipidique, dans le cadre d'un régime enrichi. Ce projet sera réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, afin de mettre en évidence l'impact de la suppression du gène, par comparaison avec des animaux contrôles non modifiés. Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vitro ou in silico ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme. Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 360 souris. Ces lignées ne concerneront que des phénotypes non dommageables et une étude rétrospective sera mise en place le cas contraire. Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées en comparaison avec des animaux contrôles. Une cohorte de 36 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ces animaux seront soumis à un protocole comportant différents tests permettant de caractériser les capacités d'homéostasie lipidique, à différents âges ; mais aussi à des tests permettant de caractériser la lignée, lorsque celle-ci n'a pas encore été étudiée sur certains domaines (fonction cardiaque par exemple). Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Cette batterie de tests permet de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette délétion sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse. Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation. Les souris utilisées sont issues de lignée en cours d'élevage et pour lesquelles aucun phénotype léthal ou majeur n'a été observé.

1345- La bronchiolite est une maladie pulmonaire des très jeunes enfants qui se caractérise par l'obstruction des voies respiratoires en réaction à une infection par le virus respiratoire syncytial (VRS). Un tiers des nourrissons développeront une bronchiolite pouvant conduire à une hospitalisation. Par ailleurs, la bronchiolite est un facteur de risque pour le sujet à développer de l'asthme en grandissant. Aujourd'hui, il n'existe aucun vaccin ni traitement efficace pour protéger les

nourrissons contre cette infection et ses conséquences pulmonaires. La réaction immunitaire néonatale contre ce virus est peu décrite. Nos recherches ont démontré que la réponse du tissu pulmonaire du souriceau est très différente de celle de la souris adulte. Notre objectif est de définir les déterminants moléculaires et cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire au cours de l'infection VRS chez le souriceau et d'analyser leurs conséquences à l'âge adulte. Comprendre ces différences de réponse en fonction de l'âge nous permettra de proposer des traitements adaptés pour protéger le nouveau-né contre ces infections respiratoires. L'obtention d'une réponse immunitaire repose sur la capacité de plusieurs cellules de l'organisme à interagir ensemble. La complexité de cette réponse nécessite d'être étudiée à l'aide de modèles animaux. Le VRS humain se réplique dans les poumons des souris où il est possible d'étudier la réponse immunitaire. Le souriceau BALB/c est reconnu comme modèle pour caractériser les réponses immunitaires néonatales contre le VRS, et étudier leurs conséquences pathologiques lors d'une ré-exposition au virus à l'âge adulte. De plus, le souriceau de moins de 7 jours est considéré équivalent à un bébé de 2 mois au point de vue immunologique. Afin de caractériser la réponse immune du souriceau au VRS, nous disposons de 8 lignées de souris déficientes pour un des acteurs de la défense immunitaire. De plus, nous pouvons traiter les souriceaux par des modulateurs du système immunitaire pour augmenter ou réduire une population cellulaire donnée avant l'infection virale (4 traitements immunomodulateurs). Ainsi, notre objectif implique d'étudier la réponse immunitaire pulmonaire au VRS de souriceaux transgéniques ou traités par un immunomodulateur par rapport à celle d'animaux contrôles. Notre projet s'étalera sur une période de 5 ans et nécessitera au maximum 2760 souriceaux. Le nombre d'animaux dans une expérience répond à des besoins statistiques pour attester d'une différence biologique et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins. Les souriceaux sont élevés avec leur mère (2 portées/cage), avec du matériel pour nidifier (papier mouchoir) depuis leur naissance jusqu'au sevrage. Les nouveau-nés sont infectés par le VRS à l'âge de 6 jours et sont maintenus avec leur mère, observés tous les jours par le personnel de l'animalerie jusqu'à leur autopsie (2, 4 et 7 jours post-infection). Pour certaines expériences, les souriceaux sont maintenus avec leur mère pendant la première infection puis sont ré-exposés au virus à l'âge adulte (trois à quatre semaines après le sevrage) afin de révéler l'empreinte immunitaire de la première infection néonatale. A l'autopsie, les poumons, la rate et les ganglions seront prélevés pour analyser différents paramètres immunologiques.

1346- Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme. Parmi l'arsenal thérapeutique disponible, la chimiothérapie à base de cisplatine est la plus fréquemment prescrite. L'effet anti-tumoral de cet agent repose sur sa capacité à créer des dommages dans l'ADN des cellules tumorales. Les dommages dans l'ADN cellulaire sont normalement pris en charge et réparés par une machinerie cellulaire de réparation de l'ADN qui peut agir selon plusieurs mécanismes, encore appelés « voies de réparation de l'ADN ». Le choix cellulaire d'une de ces voies de réparation peut déterminer la toxicité du cisplatine et donc la réponse tumorale au traitement. Par conséquent, il est crucial de comprendre comment les cellules tumorales réparent les dommages de l'ADN afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuellement proposées.

Ce projet propose une approche nouvelle visant à identifier les voies de réparation de l'ADN utilisées par les cellules tumorales. Des cellules humaines de cancer du poumon fraîchement isolées vont être transplantées dans le poumon de souris immunodéprimées afin de créer une tumeur identique à la tumeur humaine d'origine. Par ailleurs, un « traceur » moléculaire de la réparation de l'ADN va être injecté dans les cellules tumorales. Ce traceur doit marquer les cellules tumorales d'une « couleur » fluorescente différente selon la voie de réparation utilisée par cette cellule. Ce projet vise à obtenir des données scientifiques destinées à améliorer le traitement du cancer du poumon tout en ayant un impact aussi limité que possible sur le bien-être animal. Ainsi, les trois règles fondamentales d'une démarche éthique en expérimentation animale seront mises en application tout au long du projet. Cette étude, nouvelle à notre connaissance, est basée sur des données scientifiques obtenues en utilisant des modèles expérimentaux *in vitro* qui ne permettent cependant pas de récapituler l'environnement cellulaire présent au sein d'une tumeur. Ainsi, pour étudier la réponse de cellules tumorales aux dommages de l'ADN, des modèles de greffes de tumeur sont actuellement incontournables. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera au maximum de 916 souris. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats fiables. Dans ce but, une étude statistique a été réalisée lors de la conception des protocoles expérimentaux. Pour des raisons expérimentales pratiques, la souris est le modèle animal le mieux adapté aux protocoles décrits dans ce projet. Elle est de taille suffisante pour réaliser les injections de cellules tout en étant raisonnablement facile à élever dans des conditions optimales. Des lignées de souris immunodéficientes permettent par ailleurs de réaliser des greffes de cellules tumorales humaines et permettent ainsi de créer des modèles animaux de cancers du poumon humains. Les souris seront utilisées dès qu'elles auront atteint l'âge adulte afin de limiter le temps de maintien des animaux à son minimum nécessaire. Les procédures les moins invasives possibles ont été choisies. Par ailleurs, un dispositif anesthésique et analgésique adapté sera mis en place lors des protocoles, et les méthodes de pharmacologie pour les greffes et les administrations seront les méthodes à l'état de l'art. En résumé, les modèles de cancers du poumon humains chez l'animal créés dans le cadre de ce projet devraient permettre d'étudier la réparation de l'ADN dans les cellules tumorales humaines placées dans un contexte proche de leur environnement naturel.

1347- La digestibilité des acides aminés est un critère fondamental d'évaluation de la qualité des protéines alimentaires. Sa détermination *in vivo* requiert actuellement des méthodes invasives pour recueillir les contenus de l'intestin, comme l'utilisation de canules chez le porc ou de sondes intestinales chez l'Homme. Afin de pouvoir évaluer l'impact sur les populations humaines de l'introduction de sources protéiques alternatives à celles usuellement consommées, il est nécessaire de développer des nouvelles méthodes pour s'affranchir des mesures dans l'intestin grêle. L'utilisation de protéines alimentaires marquées avec des isotopes stables (qui n'émettent pas de rayonnement) et le suivi de ces isotopes dans le sang

est une méthode envisagée. Nous avons marqué des protéines de lait avec deux isotopes stables, ^{15}N et ^2H . Les protéines de lait marquées seront incorporées à un repas test destiné à être ingéré par un groupe de 12 rats. Des prises de sang seront effectuées régulièrement après le repas. Au bout de 6 heures, les animaux seront euthanasiés de manière à récupérer les contenus digestifs. L'apparition de ces isotopes stables dans le sang sera analysée et comparée à celle obtenue dans les contenus digestifs. Nous pourrions ainsi conclure sur la validité de ce marqueur sanguin comme critère de biodisponibilité des acides aminés alimentaires. Cette étude méthodologique est un préalable au développement de ces méthodes peu invasives chez l'Homme, qui permettront d'évaluer la qualité des sources protéiques. Ceci constitue un enjeu majeur pour la réflexion sur les sources alimentaires durables. L'étude est réalisée sur 12 rats ce qui constitue un nombre restreint d'animaux. Les animaux sont hébergés et manipulés dans des conditions qui n'engendrent pas de stress. Afin, le protocole expérimental ne génère pas souffrance : les prises de sang sont réalisées par un cathéter sanguin posé dans la veine de la queue sous anesthésie gazeuse, et le volume de sang prélevé est limité.

1348- Afin de satisfaire des niveaux de production élevée, les ruminants reçoivent des rations alimentaires à haute valeur nutritive (riches en concentrés et modérées en fourrages), ce qui peut entraîner l'apparition de pathologies. La forte valeur nutritive de la ration peut induire une fermentation excessive des aliments suivie d'une production élevée d'acides gras volatils qui provoque une baisse du pH au niveau du rumen (premier compartiment du système digestif des ruminants qui joue un rôle fondamental dans la digestion des aliments, notamment du fait de la présence d'une population microbienne dense et variée). Pour que la digestion soit efficace, il est nécessaire de maintenir l'équilibre de cette population microbienne, équilibre pour lequel le pH du rumen est un indicateur pertinent puisque l'optimum recherché est un pH légèrement acide, mais proche de la neutralité. Cette pathologie ou acidose ruminale peut survenir chez les chèvres laitières fortes productrices. L'acidose ruminale peut provoquer des irrégularités dans l'ingestion et s'accompagner de pathologies associées (acidose aiguë, infections mammaires, ...). Elle est à l'origine d'une diminution des performances de production, variable suivant les animaux, dont les conséquences économiques peuvent être importantes. Elle impacte également la qualité du lait, le bien-être des animaux... L'absence de signes cliniques spécifiques dans les premiers stades de la maladie rend sa prévention difficile. L'analyse des acides gras de la matière grasse du lait, méthode non-invasive de prospection pourrait être une solution intéressante, car la composition du lait en acides gras est liée aux fermentations ruminales. Sur le terrain, celle-ci est réalisée par une méthode de plus en plus couramment utilisée : la spectroscopie dans le moyen infra-rouge (MIR). L'objectif de notre projet est de mieux comprendre la succession des phénomènes physiologiques conduisant à cette pathologie en provoquant une situation marquée d'acidose suite à un challenge acidogène. L'expérimentation se fera sur dix chèvres laitières en début de lactation, car c'est lorsque les animaux produisent beaucoup qu'ils peuvent développer une acidose subaiguë. Après avoir étudié pendant deux semaines les animaux soumis au régime témoin, nous leur distribuerons pendant un maximum de quatre semaines un régime acidogène afin d'étudier les modifications physiologiques et comportementales qui en résultent. Nous mesurerons des paramètres comportementaux, fermentaires, physiologiques, ainsi que le profil en acides gras du lait. Nos résultats contribueront à mieux comprendre cette pathologie courante dans la filière caprine afin d'en limiter les conséquences.

La durée totale du projet est de 6 semaines. Le projet tient compte de la règle des 3R. En effet, les animaux seront leurs propres témoins, d'où un nombre limité de 10 animaux. Les chèvres sont logées dans des cases individuelles mitoyennes, deux par deux, ce qui autorise le contact tactile avec les congénères voisines. De plus, les chèvres sont sorties 2 fois/j lors de la traite et observées quotidiennement dans leur comportement, leur niveau d'ingestion ce qui permet de déceler toute anomalie très rapidement. Un certain nombre d'expérimentations sur l'acidose ont été conduites *in vitro*. Cette étude tient compte des résultats obtenus *in vitro*, mais elle nécessite l'utilisation d'animaux pour comprendre et interpréter les phénomènes physiologiques au niveau du métabolisme de l'animal en production et entre les différents organes (rumen, mamelle...).

1349- L'objectif de notre projet de recherche est de comprendre les interactions entre la bactérie *E. faecalis* et son hôte, *in vivo*, au niveau du tractus intestinal. *E. faecalis* est une bactérie inoffensive appartenant à la flore sous-dominante du microbiote adulte humain et murin. Bien qu'inoffensive pour les individus sains, *E. faecalis* est aussi à l'origine d'un nombre croissant d'infections opportunistes chez des personnes immunodéprimées ou affaiblies. Jusqu'à présent, l'existence de modèles animaux peu adaptés pour l'étude du processus infectieux d'*E. faecalis* a limité notre connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les interactions entre *E. faecalis* et son hôte. Nous proposons d'adresser cette problématique en développant un nouveau modèle animal fondé sur l'utilisation de souris axéniques (exempt de tous germes en particulier dépourvues de microbiote intestinal). Notre projet comprend 4 axes de recherches : 1/ l'analyse de l'étape de translocation (traversée de la barrière intestinale), 2/ la caractérisation de la réponse immunitaire au niveau de la barrière intestinale contre *E. faecalis*, 3/ la détermination des mécanismes mis en jeu dans les interactions entre *E. faecalis* et l'hôte et 4/ l'impact de bactéries probiotiques sur ces interactions. Les fondements de ce projet résident dans l'utilisation de ce nouveau modèle animal et d'une souche d'*E. faecalis* qui sera inoculée aux souris. Cette approche expérimentale permettra d'intégrer la complexité des interactions entre l'hôte et un pathogène opportuniste issu du microbiote tout en limitant l'apparition des symptômes indicateurs d'une souffrance ou détresse de l'animal. A ce jour, aucune approche *in vitro* n'est disponible pour remplacer ce type de modèle et « mimer » ces interactions. Afin de réduire le nombre d'animaux mis à contribution, nous testerons d'abord différentes conditions expérimentales lors de la validation du modèle expérimental et choisirons ensuite uniquement les conditions optimales à utiliser pour la poursuite du projet. Les souris seront hébergées en cages de 5 animaux au maximum, et seront inoculées avec des doses sub-létales établies pour la souche sauvage d'*E. faecalis*. L'ensemble du projet nécessitera en moyenne 100 souris par an.

1350- La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires (chorée), déficits cognitifs et troubles de la personnalité et s'expliquent par une atteinte préférentielle du striatum dans le cerveau. De nombreux modèles murins ont été générés, dont le modèle transgénique R6/1, modèle très utilisé par la communauté scientifique. Ce modèle récapitule des phénotypes majeurs de la maladie et constitue un outil inestimable pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et la réalisation de traitements précliniques. Alors que le phénotype moteur des souris "Huntington" a été largement étudié et est utilisé comme marqueur lors des tests précliniques, le phénotype cognitif reste peu caractérisé. L'atteinte des fonctions cognitives, incluant des difficultés à mobiliser les connaissances acquises et à s'organiser et à prendre des décisions est pourtant un symptôme et marqueur précoce de la maladie, qui a un impact substantiel sur la qualité de vie des patients. Ainsi, une meilleure caractérisation des fonctions cognitives chez les souris modèles Huntington apparaît aujourd'hui nécessaire non seulement pour comprendre les mécanismes responsables des atteintes cognitives mais aussi pour évaluer de façon précoce les bénéfices potentiels d'un traitement lors de la réalisation de tests précliniques. Le striatum est nécessaire à certains apprentissages comme des automatismes moteurs, mais aussi à certains apprentissages de type declarative-like qui mettent en jeu une mémoire dite procédurale (permet de résoudre une tâche répétitive par un comportement automatique). Des tests de comportement adaptés au rongeur permettent d'étudier cette mémoire procédurale. L'objectif de l'étude proposée est de caractériser la mémoire procédurale des souris R6/1 à l'aide d'un test de comportement approprié -le labyrinthe du double-H-, développé récemment au laboratoire chez le rat et qui permet spécifiquement d'évaluer cette mémoire ainsi que son interaction avec la mémoire spatiale. L'étude se déroulera ainsi en deux étapes: 1) adapter le test du labyrinthe du double-H à la souris; 2) évaluer la mémoire procédurale des souris R6/1 dans ce test. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire (i.e. à 450 animaux) pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée de façon générale à un âge où les animaux ne sont pas atteints des symptômes les plus invalidants de la MH. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers.

1351- Les bactéries intestinales, ou microbiote intestinal, participent à de nombreux processus physiologiques. Cependant, un déséquilibre de cette flore ou dysbiose entraîne des répercussions sur l'immunité et peut être responsable de pathologies telles que l'obésité, les maladies auto-immunes et le cancer. Or, chez les patients atteints de cancer, de nombreux facteurs concourent à l'installation de cette dysbiose, comme la toxicité des chimiothérapies sur l'épithélium intestinal, la prescription d'antibiotiques à large spectre pendant la neutropénie ou les corticoïdes entraînant l'anergie lymphocytaire. Nous avons montré que certaines bactéries intestinales sont nécessaires à l'efficacité de certaines chimiothérapies et qu'une dysbiose induite par des traitements antibiotiques a des conséquences néfastes sur l'efficacité anti-tumorale de ces traitements, en particulier au niveau de l'immunité anti-tumorale. A présent, nous souhaitons approfondir les mécanismes d'action des chimiothérapies en relation avec le microbiote intestinal et améliorer les réponses aux chimiothérapies via les bactéries intestinales.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, les modèles de tumeur disponibles ont été développés chez la souris et les modèles de souris transgéniques sont indispensables à l'étude de l'immunité anti-tumorale après traitement par chimiothérapie. En effet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité et l'effet des chimiothérapies sur la réponse anti-tumorale et les relations entre la flore commensale intestinale et les cellules immunitaires dans un contexte tumoral après traitement par chimiothérapie, avec toutes les interactions nécessaires. Durant ce projet, 360 souris seront utilisées pendant la période décrite de 1 an. Ce nombre se justifie par la diversité des bactéries, des voies de signalisation et des modèles de tumeurs étudiés durant cette étude. Une resoumission annuelle précisant l'état d'avancement ainsi que les directions futures du projet est prévue. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentateurs.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en terme de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, les prélèvements sanguins hebdomadaires réalisés à la veine sous-mandibulaire n'excéderont pas 50 µl 2 fois par semaine ou 100 µl 1 fois par semaine. Les prélèvements sanguins intracardiaques terminaux seront réalisés sur les souris après anesthésie sous isoflurane, suivis de l'euthanasie des animaux.

1352- Le diabète gestationnel (DG) est une hyperglycémie découverte pendant la grossesse, pouvant entraîner des complications maternelles (accouchement prématuré, intoxication, césarienne), foetales et néonatales (complications lors de l'accouchement par voie basse : enfant trop gros, détresse respiratoire et hypoglycémies à la naissance). De plus, beaucoup d'arguments plaident en faveur d'une programmation intra-utérine des pathologies cardiovasculaires, dont l'impact semble supérieur à celui de l'hérédité génétique, pourtant si redoutée des parents. Ces complications peuvent être prévenues par l'obtention, grâce à une prise en charge adaptée, d'objectifs glycémiques stricts avant et après les repas. Lors de la grossesse les cellules β, productrices d'insuline, s'adaptent aux besoins de plus en plus importants de la mère en insuline. En revanche, lorsque ces mécanismes adaptatifs sont défaillants s'installent les hyperglycémies chroniques et un DG. Son traitement (diététique, activité physique adaptée, autocontrôle glycémique, insulinothérapie si indiquée) pour une atteinte des objectifs

glycémiques stricts, en réduit ses complications. Cependant, ce traitement est aujourd'hui assujéti à un manque de compliance des patientes (éducation de la patiente, contraignant, peur des hypoglycémies, couteux, ...), c'est pourquoi depuis une dizaine d'années l'utilisation des anti-diabétiques oraux (glyburide et metformine) sont étudiés en alternative à l'insuline et déjà proposés par certaines sociétés savantes (canadienne, anglaise, NICE, National Institute for Health and Clinical Excellence). La metformine semble être un candidat idéal pour le traitement du DG de part son efficacité à réguler les glycémies identiques à l'insuline chez des femmes obèses ayant un DG, mais également de part la diminution de certaines complications foeto-maternelles et néonatales et enfin une meilleure acceptabilité du traitement. En revanche les mécanismes cellulaires et moléculaires sont encore à déterminer afin d'envisager son utilisation en France dans le traitement du DG. Des études antérieures in vivo réalisées au laboratoire ont démontré que des rates intolérantes au glucose (ayant des difficultés à réguler la quantité de sucre dans le sang après un repas) avaient un fort stress oxydant, néfaste pour le pancréas et l'ensemble des organes touchés, et des capacités de lutte antioxydante diminuée. Sa descendance présente elle-aussi des anomalies liées au stress oxydant (pancréatique, diminution de la capacité antioxydante). L'utilisation de la metformine, ayant des propriétés anti-oxydantes découvertes il y a peu, pourrait peut-être permettre de limiter les conséquences chez la mère (prédisposition au développement du diabète à plus long terme) et chez la descendance (complications/prédispositions à long terme). Ainsi, nous allons, grâce à un nouveau modèle murin d'obésité/diabète de type 2 induit par une alimentation grasse associée à une boisson sucrée, évaluer les effets bénéfiques d'un traitement à la metformine versus insuline (traitement de référence) sur les complications materno-foetales mais aussi à plus long terme chez la mère et sa descendance. Nous pourrions ainsi mieux comprendre ces mécanismes moléculaires et cellulaires protecteurs. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer sera respectée. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (40 rats mâles et 90 rats femelles Wistar). La souffrance des animaux sera réduite au maximum. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire.

1353- Le cancer de la prostate est le cancer le plus répandu chez l'homme et est largement traité par radiothérapie externe. Cependant, le taux de rechute pour les cancers les plus avancés atteint environ 50%. Un des facteurs qui limiterait l'effet de la radiothérapie est l'hypoxie (insuffisance en oxygène au niveau de la tumeur). Cette hypoxie provient d'une architecture anormale des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. Or, nous avons observé récemment que la radiothérapie induit une meilleure perfusion vasculaire et donc réduit l'hypoxie, ce qui a potentiellement des répercussions sur le pronostic clinique. Les récepteurs aux androgènes présents à la fois sur les cellules tumorales et les cellules endothéliales (constituants des vaisseaux) jouent aussi un rôle essentiel dans le cancer de la prostate. Récemment, de nouvelles chimiothérapies visant ces récepteurs ont été développées, dont l'Abiratérone. Cependant, il n'y a aucune donnée sur leurs effets sur les cellules endothéliales, ou sur leur impact sur l'hypoxie et la radiosensibilité de la tumeur. La chimiothérapie pourrait remettre en cause certains des effets de la radiothérapie au niveau vasculaire. C'est pourquoi nous voulons tester l'irradiation combinée à la chimiothérapie dans des modèles de cancer de la prostate chez la souris. Pour cela, les tumeurs sont générées par greffe de cellules tumorales dans la prostate et traitées par chimiothérapie puis radiothérapie. Les tumeurs sont, d'une part, prélevées (sur animaux euthanasiés) et analysées pour déterminer les paramètres tissulaires (zones sans oxygène, zones perfusées, densité en vaisseaux sanguins, prolifération tumorale, etc..) et d'autre part, leur croissance est suivie par imagerie non invasive pour étudier l'impact global sur le développement tumoral. Afin d'établir les groupes d'expériences et contrôles, un nombre total de 320 souris nude (NMRInu) est estimé. Les paramètres étudiés n'existent que dans un tissu intégré dans l'organisme; il n'existe donc pas de procédure de remplacement in vitro. Pour leur confort, les animaux sont hébergés en groupe (5 max) avec enrichissement et surveillés quotidiennement.

1354- L'anticorps anti-CTLA4 est efficace dans plusieurs types de cancer tels que le mélanome ou encore le cancer de la prostate. Néanmoins, cette thérapie a un coût important et n'est efficace que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver des indicateurs prédictifs de réponse ainsi que de nouvelles combinaisons thérapeutiques pour augmenter la proportion de patients bénéficiant du traitement. Nous savons que l'anti-CTLA4 permet une réinduction de la réponse immune qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Malheureusement cette efficacité clinique est au prix d'effets secondaires pouvant être très graves. Par exemple, l'anticorps anti CTLA-4 induit des colites de haut grade chez 20 à 30% des patients nécessitant parfois l'interruption du traitement malgré une efficacité de ce dernier. Il s'avère donc nécessaire de comprendre ces mécanismes d'efficacité et de toxicité afin de pouvoir d'enrayer les toxicités tout en conservant l'efficacité anti-tumorale.

Dans cet objectif, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de cet anticorps thérapeutique, d'accroître leur efficacité grâce à de nouvelles combinaisons et de comprendre les relations entre la toxicité colique, la flore intestinale et l'immunité. Durant ce projet, 1220 souris seront utilisées en 18 mois. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, l'étendue de la diversité de la flore intestinale ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées. Ce projet nécessitera plusieurs expérimentateurs. Il s'agit d'un projet pilote qui sera étendu et redéposé si les résultats sont favorables. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement, d'une part, car elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur), et d'autre part, les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, avec des méthodes à l'état de l'art du raffinement.

1355- L'administration par voie pulmonaire d'antibiotiques sous forme d'aérosol permet de cibler directement les infections pulmonaires et d'augmenter l'index thérapeutique en augmentant l'efficacité locale et en réduisant les effets secondaires systémiques. Pour la prise en charge thérapeutique des infections pulmonaires, les formes pharmaceutiques commercialisées ou en cours d'évaluation pour l'administration pulmonaire en aérosol sont des solutions à aérosoliser (tobramycine (Tobi®), colistine (Colimycine pour inhalation), lévofloxacine (Aeroquin®)...). Ces formes sont très contraignantes pour les patients en termes de durée et de fréquence d'administration (10 à 15 minutes deux fois par jour), ce qui nuit à l'observance. Afin de réduire la durée d'administration, des poudres de principe actif pour inhalation (Tobi Podhaler®, Colibreathe®) ont été développées. Mais, dans le cas des antibiotiques absorbés rapidement au niveau de l'épithélium pulmonaire, aucune de ces formes pharmaceutiques ne permet de maintenir de façon prolongée une concentration élevée au niveau pulmonaire. Le développement de microparticules à libération prolongée d'antibiotique administrées par voie pulmonaire permettrait d'optimiser les traitements en maintenant une concentration efficace et d'améliorer le confort du patient et sa compliance au traitement en diminuant la fréquence d'administration. Les microsphères possèdent les propriétés adéquates pour une administration et un dépôt pulmonaires optimisés. Peu d'études ont cependant été menées sur le plan pharmacocinétique pour démontrer l'intérêt de telles formulations et aucun médicament de ce type n'est en cours d'évaluation chez l'homme. Le projet a pour objectif d'évaluer sur le plan pharmacocinétique une poudre sèche de microsphères chargées en antibiotiques (lévofloxacine ou chloramphénicol ou thiamphénicol ou 2 prodrogues du thiamphénicol, le glycinate et le palmitate de thiamphénicol) à libération prolongée pour la voie pulmonaire. Cette forme galénique sera comparée à une poudre sèche de microsphères à libération immédiate. Pour déterminer l'avantage de la forme poudre à libération prolongée par rapport aux autres formes galéniques (« target advantage »), une solution IV de lévofloxacine, chloramphénicol ou thiamphénicol de référence et une solution aérosolisée par voie pulmonaire seront également administrées. Pour chaque formulation et chacune des voies d'administration (intraveineuse et pulmonaire), les concentrations de antibiotique seront mesurées au niveau plasmatique et pulmonaire par lavages broncho-alvéolaires à différents temps post administration. A la fin de l'essai, les poumons seront prélevés et analysés pour déterminer la quantité d'antibiotiques résiduelle. Pour cette étude, le rat a été choisi car c'est la seule espèce rongeuse pour laquelle la technique du LBA est parfaitement décrite. 590 rats seront utilisés pour cette étude et la règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. Ainsi pour réduire le nombre d'animaux, des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA associées à un travail de modélisation pharmacocinétique en aval vont nous permettre de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes. Le remplacement des animaux est impossible car il n'existe pas de modèle alternatif qui mime les concentrations plasmatiques et pulmonaires à la suite d'une administration de substance médicamenteuse. Toutefois, le raffinement est pris en compte pendant l'expérimentation, à savoir que l'administration des antibiotiques par voie nébulisée et intraveineuse ainsi que les prélèvements sanguins et par lavages broncho-alvéolaires sont réalisés chez des rats anesthésiés. De plus entre l'administration et les prélèvements, les animaux vigiles sont placés dans un environnement thermostaté, avec libre accès à la nourriture et à l'eau et 2 par cage afin de limiter le stress lié à l'expérimentation.

1356- La micro-échographie permet d'obtenir in vivo des images échographiques d'une grande précision (la résolution est inférieure à 100 micromètres) et de visualiser des structures allant jusqu'à 1 cm de profondeur. Cette technologie est couramment utilisée en médecine humaine, notamment en ophtalmologie, mais aussi en recherche biomédicale, en particulier chez les rongeurs. Le guidage échographique est quant à lui utilisé couramment pour améliorer la précision du placement de l'aiguille lors des injections in vivo, en particulier dans les procédures médicales de rhumatologie et d'anesthésie. Dans la recherche en biologie du développement, l'injection de cellules, de marqueurs ou de virus dans les embryons sont des approches efficaces pour étudier les processus du développement. Elles peuvent être réalisées in vitro au début du développement de l'embryon (jusqu'au 6ème jour de développement sur 32 jours de gestation chez le lapin). Mais à partir d'un stade précoce de la gestation (6ème à 8ème jour chez le lapin), l'embryon se fixe dans l'utérus, on appelle cela l'implantation. Les injections dans l'embryon à partir de ce stade doivent alors être réalisées in vivo, car l'embryon est contenu et fixé dans l'utérus maternel. Elles sont alors un défi technique si elles sont réalisées à l'aveugle. La micro-injection in utero sous guidage échographique s'est alors révélée être un outil très utile chez la souris pour permettre ces injections in utero et ainsi pour explorer le développement. L'objectif de ce projet est d'adapter cette technique d'injection micro-échoguidée au lapin, ayant valeur de modèle, en ciblant les embryons in vivo au moment de leur implantation (6ème à 8ème jour), et d'utiliser ensuite la technique ainsi mise au point pour évaluer la qualité de cellules souches de lapin. En effet, la caractéristique d'une cellule souche est de pouvoir participer à la formation du fœtus lorsqu'elle est injectée dans l'embryon. Cela n'a pas encore été montré pour les cellules souches de lapin. Pour cela 11 lapines en début de gestation (entre le 6ème et le 8ème jour sur 32) seront valorisées au maximum (une lapine permettra de mettre au point la technique, puis 2 lots de 5 lapines permettront d'évaluer la qualité des cellules souches. Si l'expérience réussit grâce au 1er lot de 5 lapines, elle s'arrêtera là. Sinon un 2ème lot de 5 lapines sera utilisé). Ce nombre de lapines est le nombre minimal nécessaire à la mise au point de notre technique et à son application aux cellules souches. En effet, afin d'optimiser les chances de réussite de la procédure, la rapidité d'intervention est cruciale et peu d'embryons pourront donc être injectés par lapine. Ce nombre de lapines est ainsi le nombre minimal permettant d'envisager la réussite de notre expérience. Les études portant sur le développement embryonnaire comme la mise au point de techniques opératoires font obligatoirement appel à des mammifères. Le choix de la lapine est justifié ici car nous souhaitons étudier les cellules souches de lapin. Nos animaux bénéficieront d'une anesthésie générale associée à une puissante analgésie réduisant l'inconfort lié au geste chirurgical et réduisant le stress subi au cours des manipulations intra-utérines. Un suivi vétérinaire post-chirurgical permettra de mettre en place les traitements anti-inflammatoires et analgésiques nécessaires. Le milieu de vie des lapines

sera enrichi par du fourrage, des blocs de foin, des bâtonnets à mâcher et des balles en plastique. Un suivi quotidien des lapines sera assuré par un expérimentateur afin de contrôler leur bien-être et de les accoutumer aux manipulations.

1357- A ce jour, 90% des patients atteints de cancer décèdent de leurs métastases. L'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement local est la première étape de la cascade métastatique et, à ce titre, une cible thérapeutique stratégique. Notre laboratoire a entrepris d'étudier l'invasion de type collective, un mode de dissémination prépondérant dans les carcinomes.

L'invasion collective s'oppose à l'invasion par des cellules indépendantes car les cellules maintiennent leurs contacts entre cellules et se déplacent en groupes, plus ou moins grands et différenciés. Notre équipe a entrepris l'étude de l'invasion collective dans les cancers colorectaux (CRC) à partir de culture organotypiques tridimensionnelles. Nous utiliserons des modèles issus de lignées tumorales de CRC humains et souhaitons compléter ces approches par des « tumoroides », petits fragments issus de tumeurs primaires humaines pouvant être étudiés *in vitro*. Ces tumeurs primaires issues de patients ont l'avantage connu d'être beaucoup plus proches de la réalité des cancers des patients que les lignées cellulaires. Le but est donc de créer des structures tumorales, appelées tumoroides, qui seront mises en culture *in vitro* dans des matrices leur permettant de survivre, proliférer et entamer un processus d'invasion que nous visualiserons par microscopie en temps réel. Pour produire le matériel de départ à la création de ces tumoroides, il est indispensable d'obtenir des fragments vivants de ces tumeurs humaines. Pour se faire, ces fragments seront greffés sur souris immunodéficientes (qui ne les rejettent pas). La banque originale de ces tumeurs a été établie et caractérisée au préalable par un consortium constitué par différents établissements hospitaliers et industries pharmaceutiques. Elles ont été prélevées, caractérisées génétiquement et pharmacologiquement, et greffées sur des souris pour évaluer leur stabilité au cours du temps (stabilité après des passages successifs sur souris), pour obtenir des modèles robustes et reproductibles de cancers, efficaces pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques ou pour connaître de nouveaux mécanismes. Cette tumorothèque représentative de la grande diversité des cas cliniques de CRC sera employée comme base de nos modèles d'études de l'invasion tumorale collective. Les tumeurs vont être choisies en fonction de différents profils génétiques tels que les profils histologiques et de mutations. Ceci permettra d'évaluer s'il existe des différences d'invasivité des tumeurs et d'identifier le ou les modèles optimaux pour l'étude de l'invasion collective. Lorsque les tumeurs seront de tailles suffisamment importantes, elles seront prélevées puis dissociées en fragments de tailles permettant une analyse microscopique. Nous avons choisi 10 tumeurs de cette collection ayant des profils mutationnels et histologiques différents pour valider l'implication de nos candidats et étudier l'influence du profil tumoral dans l'invasion collective. Ces tumeurs doivent être, dans un premier temps, implantées sur souris immunodéficientes, au nombre de 14 souris par tumeur (soit 140 souris au total pour le projet). Le développement de ces méthodes s'inscrit pleinement dans la mise en place et le développement de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux, puisque la plupart des expériences seront faites sur des explants *ex vivo*, ce qui permet, d'utiliser moins d'animaux, pour effectuer des panels de tests et de caractérisation très importants. Ces tissus tumoraux ne pouvant pas croître *in vitro*, l'utilisation d'animaux est incontournable pour disposer du matériel biologique de départ.

1358- Ce projet de recherche est réalisé dans le cadre d'un contrat de prestations recherches avec l'industrie pharmaceutique. Il consiste à évaluer d'un point de vue comportemental, l'activité antidépressive de nouvelles substances pharmacologiques chez la souris. Ces substances ont été préalablement sélectionnées pour agir sur des cibles spécifiques au sein du système nerveux central, dont le dysfonctionnement provoque des troubles dépressifs chez l'homme. Notons que ces substances ont fait l'objet d'études pharmacologiques préalables au sein de l'industrie pharmaceutique et ne représentent aucun danger pour l'animal. Elles sont administrées à des souris principalement par voie orale, ou plus rarement par voie intra-péritonéale ou sous-cutanée, à différentes doses de manière à déterminer les doses actives. Le nombre d'animaux par étude (70 en moyenne) est déterminé de manière à obtenir des résultats statistiques homogènes ainsi qu'une bonne reproductibilité des résultats au cours des différentes étapes expérimentales. Les tests comportementaux utilisés sont des procédures validées en tant que modèles d'évaluation des comportements de type dépressif chez les rongeurs. Pour le Remplacement, cette étape d'ordre préclinique implique que les nouveaux produits soient testés chez l'animal, elle est requise par la loi. Elle permet de déterminer si le médicament à l'étude peut être testé cliniquement chez l'homme. En ce qui concerne l'application la règle des 3R, les études sur le comportement servent de tests de criblage de médicaments, ils permettent de tester non seulement l'activité du produit mais également de détecter les éventuels effets secondaires que l'on ne peut pas mettre en évidence 'in vitro'. Il n'y a pas de Remplacement possible pour les études de comportement. Pour la Réduction, Chaque étude de base comprend 5 groupes de 14 sujets, une trentaine d'études sont réalisées chaque année, 10000 souris sont prévues sur les 5 ans à venir (depuis 2004, 2000 animaux sont utilisés par an). Les données font l'objet d'analyses statistiques au cours desquelles sont estimés l'effet de taille (le nombre de sujet qu'il faudrait pour avoir un effet statistiquement significatif), ainsi que l'intervalle de confiance (estimation des fluctuations d'échantillonnage, plus l'effectif de notre échantillon est grand, plus il est représentatif de la population et moins on a de chance de se tromper et de se dire que si on répétait la même expérience on obtiendrait les mêmes résultats). Ce type de données est mentionné dans chaque rapport de manière à ce que la conformité de l'analyse puisse être vérifiée par les statisticiens de l'institut pharmaceutique avec lequel je travaille. Pour le Raffinement, les animaux sont placés par dizaine dans des grandes cages ayant une surface au sol de 1820 cm² avec du matériel de nidification (nids en coton et en papier). Le comportement des animaux (moteur, social, alimentaire) est étroitement surveillé après traitement et pendant les tests.

1359- L'objectif de ce projet est de mettre en place l'utilisation d'extraits végétaux à activité antibactérienne sélective dans un modèle murin de colonisation digestive à bactérie multirésistante (E coli BLSE ou EPC) dans l'objectif d'éradiquer ces

bactéries multirésistantes (BMR) du microbiote digestif. Pour ce faire nous utiliserons un modèle de colonisation digestive à BMR chez la souris SWISS tel qu'il est observé chez l'homme en cours d'hospitalisation. Les patients hospitalisés porteurs de BMR de type entérobactéries restent porteurs très longtemps après leur hospitalisation et ce portage représente un facteur de risque en cas de réhospitalisation. La prise d'antibiotiques favorise cette colonisation prolongée ou l'émergence de ces BMR au sein du microbiote. (Maîtrise de la diffusion des BMR aux antibiotiques : Sante.gouv.fr) L'administration d'antibiotique dans ces conditions est donc contre productive. L'utilisation d'extraits végétaux à activité antibactérienne sélective (activité plus importante sur les entérobactéries que sur les anaérobies et la flore lactique) dont le mode d'action est totalement indépendant de l'activité des antibiotiques classiques pourrait être une solution écologique à ce problème de santé publique. 510 souris sur 5 ans seront nécessaires à ce projet, afin de respecter la règle des 3 R : -Remplacer : le recours aux animaux est limité à la souris. -Réduire : le modèle choisi est destiné à limiter le nombre d'animaux : afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenue, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 10 souris par lot est nécessaire. -Raffiner : Le bien-être de l'animal est pris en compte de manière à lui éviter toute souffrance inutile (expérimentation nécessitant gavages et recueil de selles).

1360- Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. Cette toxicité périphérique peut être à l'origine d'effets secondaires. L'objectif de ce projet est d'améliorer l'efficacité du traitement et de réduire la toxicité périphérique en modifiant la biodistribution de la molécule thérapeutique grâce à l'utilisation d'un nano-objet. Ceci permettra d'améliorer le ratio bénéfice-risque de traitements systémiques en oncologie. Il s'agit donc de comparer la biodistribution ainsi que l'efficacité anti-tumorale de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients). Le nano-objet est une nanoparticule organique issue de la nanotechnologie. Il est synthétisé avec des matières premières approuvées par la FDA. La molécule thérapeutique utilisée pour ce projet est la Doxorubicine, issue de la famille des médicaments.

Le projet comporte une étude de biodistribution ainsi qu'une étude d'efficacité, toutes deux réalisées sur des souris porteuses de tumeur. L'étude de biodistribution permettra d'évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans la tumeur ainsi que dans les organes et tissus sains. L'étude d'efficacité déterminera quant à elle, le retard de croissance tumorale induit par la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence.

Chacune de ces deux études inclura 60 souris nudes NMRI. La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine xéno greffée chez la souris nude est le modèle de référence pour l'étude des traitements anticancéreux à travers toute la recherche en oncologie. Il a été choisi précédemment par la société pour l'évaluation préclinique de l'efficacité anti-tumorale de produits actuellement en essai clinique chez l'homme. Le nombre d'animaux requis a été défini en fonction du pourcentage de prise de greffe du modèle tumorale MDA-MB-231-luc-D3H2LN et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale pour réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible, ce qui nécessiterait alors plus d'animaux. Les tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude ont été choisis de sorte qu'un nombre minimum d'animaux soit requis pour l'interprétation des résultats (5 animaux par groupe), par ailleurs, la détermination de points limites précis (volume tumoral < 1500 mm³, perte de poids < 20% ,...) ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort (analgésie, réchauffement...) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux au maximum. Cette procédure expérimentale permet d'évaluer les bénéfices d'une nouvelle composition thérapeutique en comparaison avec un traitement standard utilisé chez l'Homme, la complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

1361- Les cellules souches pluripotentes, à savoir les cellules souches embryonnaires (ES) ou les cellules souches pluripotentes induites (iPS), possèdent par définition deux caractéristiques : 1. La capacité d'autorenouvellement 2. La capacité de donner naissance à tous les types de cellules qui peuvent dériver des trois feuillets embryonnaires (pluripotence)

Au laboratoire nous nous intéressons plus spécifiquement à la capacité de ces cellules à se différencier en cellules du foie et notamment en hépatocytes. En effet, ces cellules sont la cible de nombreuses maladies métaboliques et leur isolement et expansion in vitro est délicate. Ainsi les hépatocytes dérivés de cellules souches constituent une source alternative de cellules disponibles à la fois pour la modélisation de ces maladies ou pour leur utilisation en thérapie cellulaire après une éventuelle correction génétique. Cependant, il est nécessaire de réaliser une caractérisation approfondie des cellules que nous parvenons à différencier à partir des cellules souches, tant pour leur potentiel thérapeutique que pour leur sécurité d'utilisation. Parmi les différents tests qui doivent être réalisés, l'un des plus stringents est l'étude de la fonctionnalité de ces cellules in vivo en fois injectées chez l'animal. Dans ce projet, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées et présentant un déficit en facteur IX, le facteur de coagulation dont la déficience est responsable de l'hémophilie B. En effet, nous allons générer des hépatocytes à partir de cellules iPS d'un individu sain, mais aussi à partir de cellules de patients atteints d'hémophilie B. Les cellules iPS spécifiques des patients seront génétiquement corrigées afin de restaurer la production de facteur IX. Les cellules différenciées en hépatocytes seront transplantées dans le foie des animaux déficients pour y restaurer une synthèse de facteur

IX facilement quantifiable dans le sang circulant. Cette transplantation sera réalisée au stade nouveau-né quand le système immunitaire des souriceaux n'est pas encore mature afin d'éviter le rejet des cellules humaines. De plus, le foie étant encore en croissance à ce stade du développement, la greffe des cellules transplantées et leur prolifération sont favorisées. Trois groupes expérimentaux sont prévus et pour chaque groupe nous aurons besoin pour avoir des résultats statistiquement significatifs d'au moins 5 ou 6 animaux KO FIX greffés. Nous aurons donc besoin de 18 portées de souris KO F9 (environ 130 souris): 6 portées pour la transplantation de cellules différenciées après correction génétique, 6 portées pour la transplantation de cellules différenciées non génétiquement corrigées, et 6 portées de souris contrôles. Un nombre élevé de souris est nécessaire pour plusieurs raisons s'affranchir de la diminution du nombre de souris au cours de l'expérimentation 1) par décès spontané des animaux hémophiles ou 2) suite au saignement possible pendant et après l'injection (malgré l'injection concomitante de FIX), 3) au fait qu'on ne peut pas faire un élevage de souris FIX hémophiles car les femelles ne mènent pas les gestations à terme en raison des hémorragies. Nous utiliserons des mères hétérozygotes pour le déficit en FIX et donc une partie seulement des souriceaux de la portée (1/4 ou 1/2 suivant que le mâle est normal ou hémophile) est hémophile 4) au fait que la maladie est liée à l'X et 5) qu'il est difficile de distinguer le sexe des animaux à la naissance. A l'heure actuelle ces expériences sont indispensables pour démontrer la fonctionnalité des cellules (capacité à synthétiser le FIX et capacité à greffer dans le foie) et donc leur potentiel thérapeutique. Ces expériences sont exigées pour les publications, et les résultats fonctionnels escomptés ne pouvant pas être obtenus autrement, elles sont indispensables en tant que modèle préclinique avant d'envisager toute application chez l'homme. Ce projet devrait nous permettre d'apporter la preuve de concept de la possibilité d'utiliser des cellules souches comme source de cellules fonctionnelles du foie et leur utilisation en thérapie, non seulement pour l'hémophilie B mais pour beaucoup d'autres maladies métaboliques hépatiques. Puisque ces expériences sont indispensables, la règle des 3R sera appliquée 1) en réduisant le plus possible le nombre de souris injectées (les expériences seront interrompues dès que nous aurons les résultats pour 5 ou 6 animaux KO FIX greffés pour chacun des types cellulaires à injecter, même si nous n'avons pas utilisé les 6 portées prévues. 2) en raffinant nos conditions expérimentales pour limiter la manipulation des souris et la pratiquer avec le plus de douceur possible afin de générer le minimum de stress et par conséquent de douleur pour la mère comme pour les petits, ce qui contribue également à limiter le nombre d'animaux nécessaire.

1362- L'émergence de résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies conventionnelles est associée à un mauvais pronostic clinique, une agressivité tumorale accrue et la possibilité d'une résistance croisée avec les cellules tueuses du système immunitaire. Les microRNA sont des médiateurs très importants dans la régulation de la survie et de la mort cellulaires mais également dans la progression d'un grand nombre de tumeurs en modifiant l'expression de leurs gènes cibles. Au sein de notre équipe, nous avons démontré in vitro dans un modèle de lignée leucémique l'implication du miR-181a dans la résistance croisée des cellules leucémiques à la lyse par des cellules tueuses naturelles Natural Killer (NK) et au traitement conventionnel par la Daunorubicine (médicament de chimiothérapie utilisée dans les leucémies). Plus précisément, les cellules leucémiques où l'expression du miR-181a diminue sont plus résistantes à la Daunorubicine et aux cellules NK. Nous nous proposons donc d'analyser in vivo le rôle du miR-181a dans le développement leucémique chez l'animal, comme modèle de la maladie humaine, dans un organisme entier. Nous désirons également analyser son rôle dans la réponse au traitement par la Daunorubicine et la réponse à la thérapie basée sur l'injection de cellules NK (mode de traitement utilisé dans la thérapie anti-leucémique). Pour cela, nous utiliserons des modèles animaux de souris immunodéficientes dans lesquelles nous injecterons des cellules leucémiques où l'expression de miR-181a est modifiée. Nous avons choisi des souris immunodéficientes car nous utiliserons des lignées leucémiques humaines, et ce modèle de souris nous permet d'éviter le rejet des cellules leucémiques par le système immunitaire. Nous organiserons nos expériences en 4 groupes : contrôle (souris non traitées), traitement par la Daunorubicine, traitement par les cellules NK issues de deux donneurs sains. Pour l'injection des cellules leucémiques, nous utiliserons la voie intra-veineuse dans la queue pour réduire la souffrance de l'animal pour mimer cliniquement la pathologie leucémique. Ce sera également le mode d'injection utilisé pour l'administration de Daunorubicine et de cellules NK, afin de mimer l'administration du traitement en clinique. L'injection intra-veineuse dans la queue se fera après contention de l'animal, et elle ne nécessite pas d'anesthésie préalable. La surveillance rapprochée des animaux et l'arrêt des expériences en cas de problème de santé ou de souffrance permettra de s'assurer d'une étude optimisée pour le bien-être. Nous utiliserons 40 souris par groupe, ce qui devrait être un nombre minimal suffisant pour pouvoir avoir des résultats statistiquement fiables. Le nombre total d'animaux pour le projet sera donc de 160. Nous utiliserons des techniques d'injection et de suivi de croissance tumoral à l'état de l'art et non douloureuses. Nous espérons montrer que les lignées leucémiques où l'expression du miR-181a est diminuée sont plus agressives et moins sensibles aux traitements (Daunorubicine, thérapie NK).

1363- Le modèle de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le primate-non-humain (PNH) est un « standard » pour évaluer de manière peu invasive les réponses immunes cellulaires et humorales chez l'homme et l'animal, ainsi que le potentiel thérapeutique et l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie. Par ailleurs, puisque ce modèle fait appel à une réponse cellulaire inflammatoire cutanée, il est également considéré comme un modèle préclinique « relevant » de divers pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires chroniques. Brièvement, ce modèle consiste à immuniser des animaux contre un antigène donné : la tuberculine, par injection de vaccins utilisés chez l'homme : le BCG, puis à étudier la réponse mémoire induite par la vaccination par injection intradermique de ce même antigène (intra-dermoréaction : IDR). Ce modèle permet d'étudier l'effet de l'injection de drogues immunosuppressives ou immunomodulatrices sur la réponse primaire (lors de la vaccination) ou sur la réponse secondaire (lors du rappel). Une nouvelle stratégie immunosuppressive (dont les applications peuvent être des traitements pour certaines maladies inflammatoires, auto-immunes, ou le rejet de greffe...) tend à bloquer

l'interaction CD28-B7 de la costimulation dans la réaction immune cellulaire. Le projet présenté ici fait partie d'une étude globale permettant de comparer l'effet de deux réactifs différents ciblant cette voie de costimulation : d'une part un antagoniste sélectif anti-CD28 (molécule FR104) qui épargne l'interaction inhibitrice CTLA4/B7, et d'autre part la molécule CTLA4-Ig (commercialisation nouvellement approuvée) dans des modèles précliniques chez le babouin. Le projet présenté ici est l'évaluation de la molécule CTLA4-Ig dans la réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le babouin. Les projets précédents (de cette étude globale) ont obtenu un avis favorable du comité d'éthique (antérieur à février 2013)

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 4. Dans un souci de respect de la règle des 3R, l'étude de pharmacocinétique/ pharmacodynamique de la molécule sera conduite de façon simultanée à la DTH sur les mêmes animaux. Chaque animal sera son propre contrôle dans l'évaluation de sa réponse à la DTH puisque les animaux recevront une première IDR avant traitement. Par ailleurs, un groupe d'animaux dits « contrôles » (sans traitement) ayant reçu plusieurs IDR consécutives a déjà été réalisé dans une étude précédente et servira de référence.

Si l'importance du microbiote intestinal en santé humaine a été démontrée, il est également considéré comme un réservoir de pathogènes opportunistes, appelés pathobiontes. *Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale appartenant à la flore sous-dominante du microbiote adulte humain et murin. Bien qu'inoffensive pour les individus sains, *E. faecalis* est à l'origine d'un nombre croissant d'infections opportunistes chez des personnes immunodéprimées ou affaiblies. Elle représente une cause majeure d'infections nosocomiales très fréquemment associées à un dérèglement du microbiote. Ces 20 dernières années, l'allongement de l'espérance de vie et les progrès de la médecine ont été associés à une augmentation de la population vieillissante et du nombre de personnes immunodéprimées ou affaiblies, et ont conduit à l'émergence de ces pathogènes opportunistes issus du tractus gastro-intestinal. La compréhension de ces infections d'origine humaine est devenue aujourd'hui un défi majeur. Les recherches de notre équipe portent sur l'étude de la pathogénie d'*E. faecalis* dans le contexte du microbiote intestinal. Notre objectif est de comprendre au niveau moléculaire les mécanismes qui permettent à *E. faecalis* d'adopter un mode de vie pathogène chez l'homme. Nous avons identifié plusieurs gènes d'*E. faecalis* pouvant coder des facteurs de colonisation et de virulence. Nos recherches actuelles portent sur le fonctionnement de ces gènes et sur leur rôle dans le pouvoir pathogène d'*E. faecalis*. Pour se faire, nous souhaitons réaliser des tests d'infectivité et de virulence chez le modèle murin. Cette approche expérimentale permettra d'intégrer la complexité des interactions entre le microbiote intestinal, l'hôte et un pathogène opportuniste issu de ce microbiote. A ce jour, aucune approche *in vitro* n'est disponible pour remplacer ce type de modèle et « mimer » ces interactions. Afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés, nous porterons une attention particulière à la reproductibilité des expériences. Nous veillerons à ce que la réalisation de ce projet soit conforme aux exigences de raffinement liées à l'expérimentation animale. Les souris seront hébergées en petit nombre, ne seront pas soumises à des périodes de jeûne pendant la durée de l'expérience. L'ensemble du projet nécessitera en moyenne 400 souris par an et offrira des résultats importants pour le développement des différentes thématiques portés par les membres de l'équipe sur la caractérisation de nouveaux effecteurs des pathobiontes en général et d'*E. faecalis* en particulier.

1364- Depuis 2004, les cancers représentent la première cause de mortalité en France devant les maladies cardiovasculaires. En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine a été estimé à 355 000 et le nombre de décès à 148 000 (85 000 hommes et 63 000 femmes). (Site: <http://www.e-cancer.fr/soins/les-chiffres-du-cancer-en-france/epidemiologie-des-cancers>).

Parmi les nombreux mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression des tumeurs solides, la communication directe des cellules cancéreuses avec les cellules adjacentes a retenu l'attention des chercheurs depuis les années 1980. En effet, la rupture du dialogue avec les cellules saines contigües correspond à l'un des 1ers stades du développement cancéreux. Cependant, les travaux plus récents démontrent que ce type de communication intercellulaire (et les protéines qui en sont responsables, les connexines) jouerait un rôle plus complexe avec un effet pro-tumoral lors de la dissémination dans le reste de l'organisme. En effet, la possibilité de communication des cellules tumorales avec les cellules des vaisseaux ou de sites métastatiques secondaires augmenterait l'agressivité et la propagation du cancer. La stratégie que nous cherchons donc à développer et valider correspond à une thérapie anticancéreuse exploitant les propriétés inhibitrices de cette communication de molécules de la pharmacopée humaine, déjà utilisées pour d'autres pathologies. Ces molécules ont été sélectionnées par screening à partir de 162 molécules grâce à leur propriété d'inhibition de la communication intercellulaire *in vitro* et codées « THN ». L'objectif de la présente étude consiste à tester sur la souris Nude les propriétés anticancéreuses des THNs, déjà démontrées *in vitro*, dans les modèles de cancer les plus invasifs (Gliome) et les plus métastatiques chez la femme (sein) et chez l'homme (prostate). Ces produits THN étant déjà utilisés en médecine humaine mais dans d'autres indications, leur évaluation en cancérologie humaine sera beaucoup plus rapide comparativement aux nouvelles entités chimiques. Dans cette démarche, nous avons identifié *in vitro* les 2 THNs les plus efficaces sur les propriétés invasives et métastatiques des cancers ciblés. Pour mener à bien le projet, nous souhaitons mettre en place 2 protocoles expérimentaux sur des souris NUDE afin de: 1/ Vérifier l'absence d'effets des THNs sélectionnés sur la croissance tumorale primaire et déterminer la dose la plus efficace dans nos conditions, 2/ Tester l'effet des THNs sélectionnés sur la capacité de dissémination locale ou métastatique des cellules tumorales. Un total de 288 souris NUDE sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet. Afin de respecter la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, les protocoles expérimentaux seront mis en place de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. En effet, pour éviter de devoir reproduire inutilement les expériences, le nombre d'animaux nécessaires pour avoir une réponse convaincante a été calculé et les conditions d'élevage et d'expérience ont été étudiées afin d'assurer les bonnes conditions de réalisation des protocoles. De plus, les THN sélectionnés ont déjà été évalués sur des animaux dans le cadre d'autres pathologies ce qui limitera le nombre de souris utilisées. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour raffiner au mieux les protocoles expérimentaux, notamment pour la

définition de points de contrôle et de points limites (comportementaux et physiques) et pour l'utilisation d'antalgiques. En outre, de nombreuses données d'Absorption - Distribution - Métabolisme - Excrétion (ADME) et Toxicologie sont disponibles dans la littérature, réduisant également le recours à l'animal sur ces aspects. Cependant, dans le cadre de la progression tumorale et la dissémination métastatique dans l'organisme entier, aucune donnée in vivo n'est disponible et aucun remplacement par une méthode alternative n'est possible. L'évaluation de l'effet des THNs sur l'animal fait donc l'objet de la présente demande d'expérimentation dans un cadre préclinique.

1365- - Etude réglementaire: Les études de tolérance répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL43).

- Objectif du projet: L'étude vise à évaluer en laboratoire l'innocuité d'un produit pharmaceutique vétérinaire à base de fenbendazole chez les volailles. L'objectif est d'établir la marge de sécurité du produit étudié, et dans la mesure du possible, d'identifier les effets indésirables en cas de surdosage ou d'administration prolongée par rapport aux conditions d'utilisation prévues.

Globalement, l'évaluation de l'innocuité générale passe par l'administration du produit aux poulets par la voie recommandée (ici le produit est donné dans l'eau de boisson). Les animaux seront répartis en 4 groupes: 1 lot d'animaux contrôle négatif, 1 lot d'animaux traité à la dose maximale prévue (1 mg/kg de poids corporel), et deux lots d'animaux traités avec 3 fois et 5 fois la dose maximale prévue (3 et 5 mg/kg de poids corporel). La durée de traitement pour ces 4 groupes étant de 3 fois la durée d'administration maximale prévue soit 3 x 5 jours = 15 jours. L'évaluation de l'innocuité repose ensuite sur l'enregistrement de différents critères révélateurs de potentiels effets indésirables du produit administré (examens cliniques des animaux, ingérés d'aliment et d'eau, examens complémentaires sur prélèvements réguliers de sang). Un examen post-mortem sera réalisé en fin d'étude (7 jours après l'administration du dernier traitement) pour déceler d'éventuelles lésions macroscopiques et histologiques sur différents organes. - Bénéfice attendu de l'étude : les études de tolérance sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire. L'étude permettra de déterminer la marge de sécurité du produit étudié, et dans la mesure du possible, d'identifier les effets indésirables en cas de surdosage ou d'administration prolongée par rapport aux conditions d'utilisation prévues. - Animaux : poulets fermiers mâles et femelles entre 7 et 10 semaines d'âge. Pour l'évaluation de la tolérance, le nombre minimal de poulets est fixé à 8 par groupe, soit 4 x 8 = 32 poulets pour l'étude. Huit animaux "spare" seront également commandés. - Dommages attendus : La souffrance attendue est modérée et correspond aux prélèvements de sang veineux effectués en début et fin d'étude. Le volume de sang prélevé sera de 2 ml avec un intervalle de 21 jours entre les deux prélèvements (volumes <10% du volume circulatoire pour un poulet de cet âge). L'hébergement des oiseaux en cage individuelle, les pesées (à l'arrivée, à D0 et avant abattage) et les allés-et-venus répétés du personnel animalier pendant la période de traitement peuvent également être sources de stress. L'abattage des oiseaux en fin d'étude sera effectué par percussion de la boîte crânienne par des personnes expérimentées, dans une pièce dédiées séparée du reste des animaux. L'hébergement et le soins aux animaux sont conformes à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Conformément à la loi, les animaux ayant reçu le produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013). - Application des 3Rs : Remplacement : le projet répondant à des exigences réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit. Réduction : le nombre d'animaux est celui requis pour obtenir une analyse statistique valide. Huit poulets supplémentaires ("spares") seront commandés afin d'obtenir des groupes homogènes de 8 animaux. En effet, un allotement sera réalisé avant le début de l'étude afin de minimiser les différences entre les groupes en terme de poids, d'état de santé et de comportement. Raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La contention des animaux vise à limiter au maximum leur stress. Les conditions d'hébergement des animaux sont adaptées aux mieux aux besoins physiologiques de ces derniers pour leur permettre d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements (cages grillagées contigües, paille, atmosphère contrôlée dans le bâtiment). Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires.

1366- Ce projet se résume à l'administration d'un gène thérapeutique via un vecteur dans l'oeil d'un lapin par une injection dans une structure oculaire suivie éventuellement d'une électroporation appliquée sur cette structure. La méthode d'administration est identique à celle réalisée chez l'homme. Cette application de thérapie génique est destinée aux traitements de maladies oculaires chez l'homme, sévères ou réfractaires à tout traitement et potentiellement cécitantes. Ce projet permet d'évaluer la toxicité potentielle et la biodistribution tissulaire du gène thérapeutique chez l'animal. L'animal choisi est le lapin qui est l'espèce la plus couramment utilisée pour l'évaluation de la toxicité oculaire. L'oeil de lapin est suffisamment grand pour permettre la réalisation de traitements spécifiques. Une espèce non pigmentée de lapin, telle que le New-Zealand White Rabbit est habituellement utilisée et acceptée par les autorités réglementaires. L'évaluation de la toxicité et la biodistribution tissulaire d'un composé biologique administré in situ sont 2 étapes qui ne peuvent pas être réalisées in vitro. Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ce type de procédure de traitement, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 600 lapins. Les 2 yeux de l'animal sont traités pour réduire le nombre d'animaux de 50%. Le nombre d'animaux utilisés est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats robustes d'un point de vue statistique et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer la biodistribution. L'administration du produit biologique est réalisée sous anesthésie générale et locale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur. Des soins adéquats sont appliqués pour éviter l'inconfort et la

douleur éventuelle post-traitement. L'hébergement des lapins est effectué dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement.

1367-

1368- Etude réglementaire: Les études de résidus répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL48). - Objectif du projet: L'étude vise à évaluer en laboratoire les déplétions de résidus de fenbendazole, un anthelminthique, administré à des porcs, dans le but d'établir les délais d'attente pour la consommation de la viande et des abats selon les prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL48). Globalement, la déplétion des résidus passe par l'administration du produit dans l'eau de boisson à des porcs à la dose recommandée de 2.5 mg / kg de poids corporel pendant 2 jours consécutifs. Les temps d'abattages sont fixés à +1, +3, +4 et +5 jours après la fin du traitement. Des échantillons de peau/graisse, muscle, foie et reins seront prélevés sur chaque animal et congelés à -70°C. En fin de phase animale, les échantillons seront envoyés congelés au laboratoire d'analyse, lequel dosera le fenbendazole et ses dérivés (fenbendazole sulphone et oxfendazole sulphone) dans les tissus. - Bénéfice attendu de l'étude : les études de déplétion de résidus sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire administré à des animaux de production. L'étude permettra de déterminer les délais d'attente pour la consommation de la viande et des abats chez le porc. - Animaux : jeunes animaux mâles et femelles entre 40 et 50 kg (3,5 - 4 mois d'âge). Pour l'évaluation des résidus dans les viandes, le nombre minimal d'abattages permettant de définir les délais d'attente est de 4. Le nombre de porcs est fixé à 4 par groupe d'abattage, soit 4 x 4 = 16 porcelets pour l'étude 2 animaux "spare" seront également commandés (1 mâle et 1 femelle) Les animaux seront hébergés sur paille avec accès à un abreuvoir et une mangeoire par case. L'étude nécessite que les animaux soient hébergés individuellement afin de pouvoir mesurer l'ingéré d'eau de chaque animal. Ce type d'hébergement déroge à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Afin de réduire le stress lié à l'hébergement individuel et de permettre aux animaux d'exprimer aux mieux leur gamme normale de comportements, les cases seront séparées les unes des autres par des barreaux, permettant aux animaux de deux cases adjacentes de se voir et de se toucher. Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par les animaliers et/ou les vétérinaires. - Dommages attendus : La souffrance attendue est légère et correspond au stress des animaux dû à l'hébergement en cage individuelle, aux pesées (à l'arrivée, à D0 et avant abattage). Conformément à la loi, les animaux ayant reçu le produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013). L'abattage est réalisé par étourdissement suivi de saignée. - Application des 3Rs : Remplacement : le projet répondant à des exigences réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit. Réduction : le nombre d'animaux est celui requis pour obtenir une analyse statistique valide. Raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La contention des animaux vise à limiter au maximum leur stress. La souffrance légère induite par l'étude est nécessaire pour déterminer les délais d'attente du produit.

1369- Etude réglementaire: Les études de résidus répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL48). - Objectif du projet: L'étude vise à évaluer en laboratoire les déplétions de résidus de fenbendazole, un anthelminthique, administrés à des volailles, dans le but d'établir les délais d'attente pour la consommation de la viande selon les prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, VICH GL48). Globalement, la déplétion des résidus passe par l'administration du produit dans l'eau de boisson à des poulets de ferme (jeunes adultes matures) à la dose recommandée de 1 mg /kg de poids corporel pendant 5 jours consécutifs. Les groupes d'animaux seront abattus à +1, +4, +6 et +7 jours après la fin du traitement. Des échantillons de peau/graisse, muscle, foie et reins seront prélevés sur chaque oiseaux et congelés à -70°C. En fin de phase animale, les échantillons seront envoyés congelés au laboratoire d'analyse, lequel dosera le fenbendazole et ses dérivés (fenbendazole sulphone et oxfendazole sulphone) dans les tissus. - Bénéfice attendu de l'étude : les études de déplétion de résidus sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire. L'étude permettra de déterminer les délais d'attente pour la consommation de la viande et des abats chez le poulet. - Animaux : poulets fermiers mâles et femelles entre 7 et 10 semaines d'âge. Pour l'évaluation des résidus dans les viandes, le nombre minimal d'abattages permettant de définir les délais d'attente est de 4. Le nombre de poulets est fixé à 6 par groupe d'abattage, soit 4 x 6 = 24 poulets pour l'étude 6 animaux "spare" seront également commandés. - Dommages attendus : La souffrance attendue est légère et correspond au stress des animaux dû à l'hébergement en cage individuelle, aux pesées (à l'arrivée, à D0 et avant abattage) et aux passages répétés des animaliers pendant la période de traitement. Un étourdissement par électronarcose est réalisé avant la saignée. L'hébergement et le soin aux animaux sont conformes à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Conformément à la loi, les animaux ayant reçu le produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013). - Application des 3Rs : Remplacement : le projet répondant à des exigences réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit. Réduction : le nombre d'animaux est celui requis pour obtenir une analyse statistique valide. Raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La contention des animaux vise à limiter au maximum leur stress. La souffrance légère induite par l'étude est nécessaire pour évaluer déterminer les délais d'attente du produit. Les conditions d'hébergement des animaux sont adaptées aux mieux aux besoins physiologiques de ces derniers pour leur permettre d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements (cages grillagées contigües, paille, atmosphère

contrôlée dans le bâtiment). Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires.

1370- La leptospirose est une maladie due à des bactéries, les leptospires. Ces bactéries peuvent infecter pratiquement tous les mammifères terrestres, notamment l'homme. Elle est considérée comme la zoonose la plus répandue dans le monde. L'homme est sensible à toutes les souches de leptospires et ces souches peuvent entraîner des symptômes et des complications graves (atteinte irréversible des reins) voir mortelle. Le chien est une espèce particulièrement sensible cliniquement à la leptospirose. Ces animaux vont présenter des signes cliniques marqués, qui peuvent évoluer jusqu'à la mort de l'animal. Bien qu'il existe des vaccins, ceux-ci n'empêchent pas l'infection du chien contre l'ensemble des souches de leptospires (l'immunité n'est acquise que contre les souches présentes dans ces vaccins). Le chien vacciné peut donc devenir un porteur excréteur urinaire. Ce qui fait du chien une espèce source de contamination majeur pour l'homme et les autres espèces domestiques, et ceci par contact direct (contact avec l'urine) ou indirect (eau souillée par l'urine). Le but de ce projet est de valider un protocole d'infection à la leptospirose chez le jeune chien et le chien adulte afin de tester l'efficacité de vaccins contre cette infection. A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'évaluer in vitro l'efficacité d'un vaccin contre la leptospirose. C'est pourquoi nous devons faire appel à un modèle animal. Le modèle chien a été choisi car c'est l'espèce cible des futurs vaccins à tester conformément à la monographie 0447 de la Pharmacopée Européenne. Ces études vont nécessiter 24 animaux pour la mise en place du modèle et environ 84 pour l'évaluation de l'efficacité des vaccins à tester. Les chiens seront maintenus dans un environnement adapté. De plus, une équipe spécialement formée prodiguera des soins adaptés aux animaux et leur fournira un environnement social adapté à leurs besoins.

1371- Notre laboratoire est un centre national de référence et centre collaborateur OMS impliqué dans l'étude des maladies infectieuses.

La lèpre est une maladie infectieuse chronique provoquée par le bacille *Mycobacterium leprae*. Elle demeure un problème majeur de santé publique, car la maladie reste endémique dans plusieurs pays au monde. Elle touche principalement la peau, les nerfs périphériques, la muqueuse des voies respiratoires supérieures ainsi que les yeux. Cependant, plusieurs éléments restent inconnus dans la physiopathogénèse de cette maladie. *M. leprae* se multiplie très lentement et la période d'incubation de la maladie est d'environ cinq ans. Les symptômes peuvent apparaître au bout de 20 ans. A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode qui permet la culture in vitro de cette bactérie, ce qui représente un obstacle majeur dans son diagnostic, ainsi que dans l'étude de la maladie qu'elle engendre. L'objectif de ce projet consiste à produire et à amplifier cette bactérie en l'inoculant à un animal de laboratoire sensible afin de réaliser le diagnostic par sérologie, mais notamment pour mettre au point une méthode rapide d'identification par la spectrométrie de masse. Les souris nues seront utilisées. Pour le confort des souris, un enrichissement sera réalisé à l'aide des igloos. L'infection et le prélèvement sanguin seront réalisés sous anesthésie et les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter une quelconque souffrance. Pour ce projet 50 souris seront utilisées.

1372- Ce projet a comme but principal de mettre en évidence les mécanismes neurobiologiques responsables des effets positifs de l'exposition à un environnement stimulant sur l'addiction à la méthamphétamine et plus particulièrement sur les risques persistants de rechute. Il est généralement admis que les drogues altèrent de façon durable le fonctionnement du cerveau et par conséquent, le comportement et qu'elles induisent ainsi un état de dépendance. Notre hypothèse est qu'une exposition à un environnement stimulant contrecarre ces altérations et normalise le comportement en permettant un retour vers un état non-addict. En effet, des études ont déjà montré que l'exposition à un environnement stimulant réduit la recherche d'autres drogues comme la cocaïne. Nous allons utiliser des modèles animaux d'addiction et nous allons les combiner avec des mesures neurobiologiques pour évaluer les changements cérébraux induits par la méthamphétamine d'une part et par l'exposition à un environnement stimulant d'autre part. Notre protocole expérimental inclut 4 phases. La phase 1 correspond à la chirurgie pour l'implantation d'un cathéter de façon chronique dans la veine jugulaire des rats. La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue. La phase 3 correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats seront hébergés soit dans un environnement enrichi, soit dans un environnement standard, ceci dans une pièce d'hébergement de l'animalerie où ils n'ont pas accès à la drogue. La phase 4 correspond au test de rechute et concerne la moitié des animaux. Cette phase consiste à réexposer les animaux aux cages d'auto-administration pour mesurer le comportement de recherche de drogue qui est utilisé comme mesure des risques de rechute à la méthamphétamine. Ceci nous permettra d'évaluer si l'exposition à l'environnement enrichi a des effets bénéfiques sur l'addiction à cette drogue et d'étudier la réactivité cellulaire aux stimuli associés à la drogue en fonction de l'environnement d'hébergement pendant le sevrage. Nous avons pris en considération la règle de 3Rs. Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique (l'addiction), peut être uniquement mené sur un animal vivant (pas de remplacement par d'autres systèmes possible). Nous utilisons des méthodes expérimentales validées et reproductibles et des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettent de réaliser plusieurs comparaisons entre les groupes tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Nous avons calculé que, pour cette étude, 560 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement. Pour le critère "raffinement", nous prendrons des mesures appropriées (soins ou sacrifice) en cas de souffrance des rats. Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction et de la rechute chez l'homme, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie.

1373- La nature de l'alimentation influence la qualité des produits carnés de ruminants et certaines crises alimentaires ont entraîné un besoin d'authentification de l'alimentation des herbivores. Les consommateurs expriment des réticences face à l'intensification des conditions de production et ils ont une image positive des systèmes herbagers à faibles intrants, d'où l'intérêt de pouvoir authentifier les produits qui en sont issus. Les recherches montrent cependant un risque accru de défauts de flaveur de la viande d'agneau produite dans les systèmes herbagers à faibles intrants en lien avec une production accrue de scatole (composé odorant) dans le rumen. Cette dernière s'accroît avec la proportion de légumineuses dans la ration, le défaut est donc particulièrement important lorsque l'animal pâture des prairies riches en légumineuses. Par ailleurs, nos travaux montrent que l'intensité de l'enrichissement de la viande en 15N, qui dépend de la proportion de légumineuses dans la ration, est un marqueur intéressant pour authentifier la viande issue de systèmes à faibles intrants. Cette expérimentation a pour but de i) tester l'intérêt de la finition de l'engraissement des agneaux d'herbe en bergerie pour réduire l'intensité de ce défaut de flaveur et ii) d'étudier la persistance de l'intensité de l'enrichissement de la viande en 15N lors d'une finition de l'engraissement de l'agneau sur un régime ne comportant plus de légumineuses. Quatre lots de 12 agneaux mâles de race Romane seront utilisés. Trente-six agneaux seront engraisés sur une prairie de luzerne entre le sevrage (à environ 2 mois) et l'abattage (à environ 6 mois); 12 pâtureront une prairie de luzerne jusqu'à l'abattage, 12 seront finis en bergerie pendant 14 jours et 12 seront finis en bergerie pendant 28 jours. Douze autres agneaux seront engraisés en bergerie avec du concentré et de la paille et abattus à même âge moyen que les autres. La luzerne sera offerte en quantité suffisante pour couvrir l'ingestion volontaire des animaux. Pour éviter les risques de météorisation, une transition sera ménagée sur plusieurs jours en début d'expérimentation et on veillera à utiliser une luzerne suffisamment riche en fibres. Des prises de sang seront réalisées en début et en cours d'expérimentation pour analyser les concentrations en scatole, en 15N, en testostérone (hormone sexuelle interagissant avec le scatole) et en caroténoïdes (marqueur de l'alimentation à l'herbe). Un prélèvement de fèces sera effectué tous les 15 jours pour surveiller le niveau de parasitisme et décider de l'opportunité d'un traitement. Le principe des 3R est respecté : nous travaillons sur l'espèce cible (qu'il n'est donc pas possible de remplacer), notre approche statistique préalable permet de limiter le nombre d'animaux et les animaliers en charge de l'expérimentation sur le terrain sont expérimentés.

1374- La réussite de la reproduction est essentielle en production laitière, et la reproduction des caprins est saisonnée. Cette saisonnalité va limiter le choix des périodes de mise à la reproduction et donc de production laitière pour les éleveurs. Or il est nécessaire pour la filière caprine de pouvoir diminuer les périodes improductives des animaux afin de répondre à la demande des consommateurs et de permettre l'étalement des revenus de l'éleveur sur l'année. Aujourd'hui, différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité. Les traitements hormonaux d'induction et de synchronisation des chaleurs et des ovulations constituent actuellement la pratique la plus efficace pour désaisonner la mise à la reproduction. Or, le contexte actuel de l'élevage s'oriente vers la réduction de l'utilisation des hormones en élevage (certaines hormones sont d'ores et déjà interdites). Par ailleurs, en agriculture biologique, les traitements à base d'hormones ou de substances analogues ne sont pas autorisés. C'est dans ce cadre que nous travaillons sur le développement de nouvelles stratégies de gestion de la reproduction « sans hormone », pour une reproduction en monte naturelle comme en insémination. L'effet mâle est une ancienne pratique d'élevage utilisée chez les petits ruminants (caprins et ovins) et qui consiste à introduire un mâle dans un groupe de femelles, préalablement séparées des mâles pendant plusieurs mois. Cette pratique est basée sur les interactions mâle/femelle via des signaux sensoriels (notamment olfactifs), et nécessite l'utilisation de mâles sexuellement actifs et de femelles au repos sexuel mais réceptives au mâle. L'intérêt de l'effet mâle réside dans son fort potentiel pour induire et synchroniser les chaleurs chez des femelles au repos sexuel, sans utiliser de traitements hormonaux. Toutefois, la généralisation de cette pratique en élevage est freinée, notamment à cause de la nécessité pour les éleveurs d'avoir un nombre de boucs suffisant, ce qui entraîne une augmentation du coût d'entretien des mâles et du temps de travail (les manipulations des boucs peuvent être contraignantes). Pour faciliter la mise en œuvre de l'effet mâle, nous travaillons sur le développement d'une méthode simple pour réaliser « un effet mâle sans mâle » grâce à l'utilisation de phéromones (ou signaux « olfactifs ») impliquées dans l'effet mâle. Notre objectif est de caractériser chez des chèvres l'activité biologique de molécules olfactives préalablement identifiées à partir de la toison de boucs sexuellement actifs. Dans le cadre de ce protocole expérimental, un total de 45 chèvres adultes en lactation et non gestantes seront utilisées. Nous ferons d'abord un test de cyclicité (2 prélèvements sanguins) sur les 45 chèvres, afin de sélectionner parmi elles 30 chèvres acycliques (c'est-à-dire en repos sexuel) qui seront réparties ensuite en 3 lots homogènes. Le 1er lot de 10 chèvres sera exposé pendant 15 jours au mélange de molécules à tester (spray intra-nasal). Le 2ème lot de 10 chèvres sera exposé à un placebo (spray intra-nasal). Le 3ème lot de 10 chèvres n'aura aucune administration intra-nasale (lot témoin sans spray). Suite à cette exposition, nous évaluerons la réponse biologique des 3 lots de chèvres grâce à des prélèvements de sang répétés, afin de doser 2 hormones impliquées dans la fonction de reproduction et présentes naturellement chez la femelle lors des cycles sexuels. Nous saurons grâce à ces prélèvements si les chèvres ont ovulé ou non suite à l'exposition au mélange de molécules olfactives. Conformité par rapport aux exigences de remplacement, réduction, raffinement : # Remplacement : cette étude ne peut pas être réalisée in vitro (nous devons évaluer la réponse biologique des femelles) et l'espèce caprine est l'espèce cible pour la mise au point d'une nouvelle méthode de maîtrise de la reproduction.

Réduction : un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au minimum le nombre de chèvres utilisées dans le protocole, tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et de conclure sur la réponse biologique des chèvres après exposition au bouquet de phéromones. # Raffinement : les chèvres seront maintenues dans leurs conditions d'élevage habituelles au sein du troupeau (elles seront notamment hébergées en groupe, sur une litière paillée) et feront l'objet d'une surveillance journalière pendant toute la durée du protocole. En cas de symptôme alarmant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. Chez la chèvre, les prélèvements sanguins sont réalisables facilement aux

2 veines jugulaires (au niveau du cou) sans nécessité d'anesthésie, car la contention de ces animaux est très aisée. Les prélèvements seront réalisés par des opérateurs expérimentés (animaliers et vétérinaires). Des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite suite aux prélèvements sanguins (tonte au niveau du cou pour une visualisation facilitée des veines, application d'un baume antiseptique et cicatrisant en massage sur les veines...).

1375- Les données épidémiologiques et histologiques révèlent que la présence répétée et soutenue dans le temps d'un infiltrat inflammatoire riche en neutrophiles est très fortement liée à un risque élevé de développer des cancers. En effet, de plus en plus d'arguments suggèrent que les cellules cancéreuses attirent les cellules inflammatoires, en particulier les neutrophiles, qui seraient alors détournées de leur fonction primaire (défense de l'hôte) et favoriseraient la prolifération, la survie et la migration des cellules tumorales. En accord avec ces relations cellules tumorales/cellules de l'immunité, des données récentes indiquent que la composition de l'infiltrat inflammatoire est contrôlée par l'activation des récepteurs purinergiques, et plus particulièrement le récepteur P2RX7. D'autre part, la découverte des petits ARN non codants, les micro-ARN ou miRs, a récemment ouvert un nouveau champ d'investigation dans le domaine de la biologie du cancer. En particulier, le miR-223 est suspecté de gouverner la maturation des neutrophiles en cellules pro tumorales. Notre projet vise à apporter un éclairage nouveau sur les interactions cellules tumorales et infiltrat immunitaire et plus particulièrement sur le rôle du miR-223 et de la protéine P2RX7, dans la croissance des cancers ainsi que la dissémination des cellules tumorales. Pour cela nous avons deux objectifs principaux, (1) déterminer l'impact du miR-223 et le rôle de P2RX7 sur la migration, la nidation et la dispersion de cellules cancéreuses pulmonaires (cellules Lewis Lung Carcinoma, LLC injectées en intraveineuse) et (2) évaluer l'impact du miR-223 sur la résistance aux drogues cytotoxiques (cisplatine, docetaxel) et à des thérapies ciblées (cetuximab) dans ces types de tumeurs. Conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées d'adénocarcinomes pulmonaires. Ces mises au point in vitro nous permettent de diminuer le nombre d'animaux. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seront prises grâce à l'application des points de points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dument qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale. Nous utiliserons pour ce projet un total de 672 souris C57Bl6, réparti entre des souris WT (168 animaux, élevage interne) et des souris P2rx7-/- (168 animaux, élevage interne) et des souris hétérozygotes. La souris est le modèle classiquement utilisé car il permet d'analyser, dans le cadre d'un modèle intégré, l'effet de différents composés (dans notre cas micro ARNs, récepteur P2RX7 et composés pharmacologiques) sur la croissance tumorale. Les expériences seront faites sur des souris C57Bl6 WT et KO pour P2RX7, phénotype non dommageable (P2rx7-/-). La souche C57BL6 est classiquement utilisée dans les expériences de croissance tumorale syngénique et elle permettra d'appréhender l'effet des miRs et des drogues pharmacologiques dans un contexte immunitaire intègre. L'utilisation de cette espèce animale nous permet par ailleurs de réduire le nombre d'animaux nécessaire car nous nous servons d'un modèle expérimental que nous connaissons parfaitement.

1376- - Etude réglementaire : Les études de pharmacocinétique répondent aux prescriptions de la réglementation européenne (European Medicines Agency, EMEA/CVMP/133/99-FINAL du 8 septembre 2000).
- Objectif du projet: Le projet vise à évaluer en laboratoire la pharmacocinétique de produits vétérinaires destinés aux animaux de rente en répondant aux prescriptions de la réglementation européenne (EMEA/CVMP/133/99-FINAL). L'objectif est d'estimer les paramètres d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'élimination du produit administré à l'animal. Dans le cas d'études de bioéquivalence, l'objectif est d'évaluer l'équivalence pharmacocinétique (ou bioéquivalence) entre un produit d'essai (un produit générique par exemple) et le produit de référence sur le marché. Globalement, l'évaluation de la pharmacocinétique passe par l'administration du produit vétérinaire à l'espèce cible concernée (bovins, ovins, caprins, porcins, équins, lapins ou volailles) à la dose maximale recommandée (une ou plusieurs administrations), par la voie recommandée. Des prélèvements sanguins sont ensuite effectués à intervalles réguliers dans les heures, jours ou semaines suivant l'administration du produit afin de suivre la concentration plasmatique du produit et/ou de ses dérivés. Dans le cas d'étude pharmacocinétique chez des animaux en lactation (bovins, ovins, caprins) après injection intra-mammaire du produit, la substance active est mesurée dans le lait à des intervalles définis suivant l'administration du produit.

- Bénéfice attendu du projet : les études de pharmacocinétiques sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout produit vétérinaire. L'étude des concentrations plasmatiques permet de déterminer les conditions d'utilisation du produit (doses, fréquence et durée du traitement) chez chaque espèce cible. - Animaux : bovins, ovins, caprins, porcins, équins, lapins ou volailles. Le nombre d'animaux est défini de façon à permettre une analyse statistique valide. Pour une étude de pharmacocinétique simple, tous les animaux reçoivent le produit d'essai dans les mêmes conditions (un seul groupe). Certaines études peuvent nécessiter plusieurs groupes afin de comparer différentes conditions d'administration (dose, voie, fréquence, etc.). Pour les études de bioéquivalence, les animaux sont répartis en 2 groupes, l'un recevant le produit d'essai, l'autre le produit de référence, à des doses identiques par la même voie d'administration. Le nombre de groupes varie en fonction du type d'étude. Le nombre d'animaux par groupe est généralement compris entre 6 et 12 pour les bovins, ovins, caprins, porcins et entre 8 et 20 pour les lapins et volailles. Considérant que le nombre moyen d'études de pharmacocinétique envisagé est de 4 par an pour les bovins, ovins, caprins, porcins ou équins, et de 2 par an pour les lapins ou volailles, nous tablons sur un nombre « enveloppe » de 240 gros animaux et 200 petits animaux sur une période de 5 ans. - Dommages attendus : La seule souffrance attendue correspond à

l'administration du produit d'essai et aux prélèvements de sang veineux effectués à intervalles réguliers sur les animaux. La souffrance attendue est classée légère pour les gros animaux (volume sanguin prélevé <10% du volume circulatoire) et modérée pour les petits animaux (volume sanguin prélevé > 10% du volume circulatoire). Dans le cas de prélèvement de lait, la souffrance attendue est légère et correspond à celle de la traite habituelle. L'hébergement et le soins aux animaux sont conformes à l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. Conformément à la loi, les animaux ayant reçu le produit en développement seront euthanasiés (dans les conditions fixées dans l'arrêté du 1er février 2013). - Application des 3Rs : Remplacement : le projet répondant à des exigences réglementaires, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation d'animaux de l'espèce de destination du produit. Réduction : le nombre d'animaux est celui requis pour obtenir une analyse statistique valide. Dans les études de bioéquivalence, une approche dite en "cross-over" peut être choisie afin de réduire le nombre d'animaux de l'étude. Dans ce cas, l'étude est réalisée en 2 phases séparées par une période de "wash-out" permettant l'élimination complète du produit de l'organisme. Les animaux d'un même groupe reçoivent le produit d'essai dans une première phase, puis le produit de référence dans une deuxième phase (ou inversement selon le plan d'étude). Chez le lapin et les volailles, lorsque des volumes sanguins importants sont nécessaires, les animaux sont alors euthanasiés puis saignés. Dans ce cas, le nombre d'individus par temps de prélèvement est diminué (entre 3 et 6) afin de réduire le nombre total d'animaux dans l'étude. Raffinement : l'espèce choisie est l'espèce cible du produit testé. La contention des animaux vise à limiter au maximum leur stress. La souffrance légère ou modérée induite par l'étude est nécessaire pour évaluer la pharmacocinétique du produit testé. Les conditions d'hébergement des animaux sont adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers pour leur permettre d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires.

1377- 1-Objectifs : Nos études visent à déterminer comment les hormones thyroïdiennes (HT) et leurs récepteurs nucléaires TR sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique aussi bien en situation normale qu'en cas de stress métaboliques (le froid, le stress alimentaire, mais surtout en réponse à des excès de calories). Nous utilisons des souris génétiquement modifiées pour étudier l'effet de l'absence de l'un ou l'autre des deux récepteurs des HT, dans un ou plusieurs tissus de l'organisme, sur le développement par ces animaux de maladies métaboliques comme le diabète, l'obésité, ou l'athérosclérose. Plus récemment nous nous sommes intéressés à la régulation des processus inflammatoires impliqués dans l'athérosclérose et qui sont modifiés en absence du récepteur TR alpha. 2-Retombées attendues : Les HT ont la capacité chez la souris et chez l'homme d'augmenter la dépense énergétique et d'entraîner une perte de poids. Malheureusement ces hormones ne peuvent pas être utilisées chez l'homme à cette fin à cause de leurs effets secondaires en particulier sur le système cardiaque. Notre approche a pour but de trouver dans quel tissu et par quels mécanismes les HT stimulent la balance énergétique. L'idée sous-jacente étant qu'avec les progrès de la pharmacologie de nouvelles molécules pourraient être générées qui ne stimulent que les activités métaboliquement bénéfiques des HT. 3-Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Nos études sont avant tout des études de paramètres physiologiques, dans lesquelles nous évaluons la réponse globale de l'organisme en réponse à des mutations ciblées. Le maintien de la balance énergétique fait intervenir de nombreux organes comme le cerveau, le foie, les tissus adipeux blancs et brun ou le muscle, qui doivent dialoguer entre eux. Les paramètres mesurés comme la composition corporelle, la glycémie, l'insulinémie, sont une résultante de l'activité de ces différents organes. Pour l'ensemble de ces études il est impossible de se passer du modèle animal vivant. Pour les études mécanistiques nous utilisons autant que possible des modèles in-vitro mais nous serons aussi amenés à utiliser des cellules en culture dérivées des animaux génétiquement modifiés (limitant quand même de ce fait le nombre d'animaux utilisés). Autant que faire se peut les différentes procédures sous un régime alimentaire ou à une température particulière sont réalisées de façon séquentielle sur les mêmes lots d'animaux, si elles ne sont pas incompatibles pour limiter le nombre total d'animaux utilisés. Une période de récupération est prévue entre les différentes expérimentations pour limiter la souffrance des animaux. Pour l'ensemble des procédures les animaux sont observés quotidiennement, en cas de souffrance les mesures adéquates sont prises (traitement, retrait du protocole, sacrifice). Le nombre minimal d'individus nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs est utilisé. 4-Nombre total d'animaux inclus dans ce projet. L'ensemble de ce projet utilisera 4115 souris.

1378- Contexte scientifique: Le nombre de maladies cardiaques résiduelles représente la première cause de décès dans le monde. Malgré les traitements actuels visant à diminuer le mauvais cholestérol, il reste plus de 17 millions de patients décédant de pathologies cardiovasculaires chaque année. Il est maintenant reconnu que l'inflammation est centrale au développement de différentes pathologies inflammatoires et cardiométaboliques mais les mécanismes qui régissent cette inflammation sont mal connus. Problématique : Un dérèglement du système immunitaire serait à l'origine de l'inflammation et pourrait être régulé par différentes voies métaboliques. Nous avons précédemment mis en évidence une altération des voies d'efflux du cholestérol des macrophages dans des maladies cardiométaboliques. Cependant la dérégulation du trafic du cholestérol intracellulaire dans les cellules immunitaires reste à ce jour mal comprise dans le contexte de maladie cardiovasculaire.

Hypothèse : Nous proposons donc d'étudier l'importance du trafic intracellulaire du cholestérol des cellules immunitaires, à travers la surexpression d'une enzyme limitante de ce trafic intracellulaire, dans des modèles précliniques de pathologies cardiométaboliques en utilisant les souris ApoE^{-/-}. Justification du modèle et raffinement : Les maladies cardiométaboliques sont des pathologies complexes impliquant de multiples voies métaboliques et physiologiques ainsi que de multiples cellules,

et donc, ne peuvent pas être étudiées simplement en utilisant une approche de culture cellulaire. Nous avons choisi le modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulation génétique liée aux maladies cardiaques. Des modèles murins (souris ApoE-/-) ont été validés comme outils d'études précliniques et permettront d'étudier la pertinence de la surexpression d'une enzyme limitante du trafic intracellulaire du cholestérol. Pour tester l'importance du trafic intracellulaire du cholestérol des cellules immunitaires dans la pathologie cardiovasculaire, il n'existe pas de méthode alternative à la transplantation de moelle osseuse dans ces modèles. En effet, cette approche permet d'étudier la modulation d'un gène spécifiquement au niveau du système immunitaire afin d'en appréhender l'importance physiopathologique pour le développement des pathologies cardiométaboliques comprenant la complexité d'un d'organisme entier. D'autre part, il est maintenant reconnu que les macrophages péritonéaux de ces souris, obtenus après injection du thioglycolate, reflètent de manière pertinente les macrophages présents dans la plaque athéromateuse. Ils permettent ainsi d'étudier *ex vivo* les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des perturbations du trafic du cholestérol dans ces cellules immunitaires. Perspectives : Ces études pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à restaurer le trafic du cholestérol des cellules immunitaires dans les maladies cardiovasculaires (première cause de décès dans le monde). Nous allons utiliser 44 souris réparties sur 4 ans. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous avons calculé au plus près le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure expérimentale, tout en garantissant la justesse des résultats obtenus. Toutes les procédures utilisées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

1379- La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans des cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAV) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAV peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Les vecteurs viraux dérivés de l'AAV sont en passe de devenir des produits thérapeutiques dont l'un d'entre eux vient d'obtenir récemment une autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'une maladie génétique rare. Néanmoins, malgré des succès récents, un des facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAV dans les essais cliniques provient de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur. Dans certains cas, celle-ci est responsable de la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme). L'objectif de ce projet repose sur le potentiel de la chimie organique pour améliorer l'« activité spécifique » et l'« index thérapeutique » d'une particule AAV recombinante choisie. Ces améliorations, non explorées jusqu'à présent, vont être obtenues par l'emploi de ligands ayant des propriétés de ciblage, couplés à la capsid d'un AAV. Ces modifications chimiques accentueront le ciblage vers un organe ou un tissu spécifique, comme le foie, la rétine ou le muscle squelettique, ce qui en retour permettra une réduction de la quantité d'AAV à administrer au patient. Au-delà de l'augmentation du tropisme cellulaire, ces capsides modifiées chimiquement pourraient également échapper en partie au moins à des facteurs naturellement neutralisants et donc diminuer l'effet de la réponse immunitaire. Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique *in vivo* et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats *in vivo*. Il est également impossible de vérifier la biodistribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. L'utilisation de la souris est donc ici justifiée pour évaluer ces deux paramètres *in vivo*. Le protocole envisagé à savoir l'administration d'AAV modifié chimiquement ou non *in vivo*, est une procédure ayant déjà été réalisée dans des modèles murins avec une bonne tolérance générale. En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'au plus 256 souris mâles pour l'expérimentation. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur.

1380- L'objectif du projet est d'évaluer l'intérêt d'une isoforme particulière inactive du récepteur membranaire c-Met en tant que biomarqueur de sensibilité au vémurafénib (médicament couramment utilisé dans le traitement du mélanome) et en tant que nouvelle cible thérapeutique. Nous avons obtenu des effets encourageants sur des cellules de mélanome en culture *in vitro* en combinant le vémurafénib et une courte séquence d'ADN favorisant une forme naturelle inactive du récepteur c-Met. Le récepteur c-Met et les signaux intracellulaires qu'il génère constituent une voie de résistance au vémurafénib. Nous voudrions appuyer nos données *in vitro* par une évaluation *in vivo* de cette combinaison de drogues administrée à un modèle murin de mélanome naturellement résistant au vémurafénib. Afin de respecter la règle des 3R, dans un souci de remplacement, l'efficacité de la courte séquence d'ADN favorisant la forme inactive de c-Met a tout d'abord été évaluée *in vitro*. Les résultats sont encourageants mais peu robustes du fait de la complexité du protocole à mettre en place, protocole qui doit notamment mimer le microenvironnement tumoral. L'utilisation d'animaux vivants est indispensable car il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle pertinent permettant l'étude des interactions tumeur-microenvironnement *in vitro*. Afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées pour ce protocole sans compromettre son résultat, nous avons estimé que 10 souris par groupe sont nécessaires et suffisantes pour obtenir un effet statistiquement significatif de la combinaison du vémurafénib et de la séquence d'ADN anti c-Met par rapport au vémurafénib seul. Pour la totalité de ce projet, un nombre maximal de 100 souris sera nécessaire. Par souci de raffinement, le vémurafénib, qui doit être administré par voie orale, est inclus dans les croquettes de façon à éviter le gavage répété des souris tout au long du protocole. Une expérience

préalable a montré que la séquence d'ADN injectée directement dans les tumeurs est efficace jusqu'à 4 jours après injection. Outre le suivi du poids des souris et de la taille des tumeurs, la manipulation des souris sera donc limitée à une injection intratumorale 2 fois par semaine.

1381- La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est une maladie sévère, pour laquelle il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. Elle progresse inéluctablement vers le décès du patient. Son pronostic est proche de celui du cancer broncho-pulmonaire (50% de survie à 2 ans). Touchant quasi-uniquement les patients âgés de plus de 50 ans, son incidence est en augmentation. Toutefois, sa cause et les mécanismes qui sous-tendent sa progression sont mal connus. Cette affection est caractérisée par la formation de tissu cicatriciel (fibrose) dans les poumons entraînant leur destruction progressive. De plus, elle est constamment associée à une réorganisation de la vascularisation pulmonaire. Dans ce contexte, le rôle des cellules souches d'origine médullaire qui participent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et aux mécanismes de la coagulation, reste à éclaircir. Ces cellules ont déjà été décrites comme dysfonctionnelles dans d'autres maladies pulmonaires. Dans la FPI, elles sont en nombre diminué mais leur prolifération est accrue lors des exacerbations de la pathologie. De plus, elles ont la capacité de se transformer en fibroblastes, cellules qui sont directement à l'origine des lésions pulmonaires. Nos hypothèses sont : - l'injection de ces cellules souches pourrait restaurer en partie les anomalies vasculaires et parenchymateuses dans un modèle de fibrose pulmonaire in vivo. - ces cellules sont dysfonctionnelles chez les patients souffrant de FPI et qu'elles participent aux anomalies des vaisseaux et à la formation de la fibrose selon un mécanisme qui reste à définir. L'implication des progéniteurs endothéliaux dans la fibrose pulmonaire a pu être mise en évidence grâce à une étude in vitro sur le sang de patients atteints de cette pathologie. Ainsi l'étape suivante et de tester le potentiel thérapeutique de ces cellules in vivo chez la souris, qui constitue maintenant le modèle irremplaçable pour confirmer l'implication de ces cellules dans physiopathologie et/ou le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique. Ce projet utilisera un modèle de fibrose pulmonaire par instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris sous anesthésie et concernera 338 souris, qui est le nombre minimal de souris ayant été calculé pour pouvoir atteindre nos objectifs en terme de significativité. L'induction d'une fibrose pulmonaire n'entraînera pas de douleur à proprement parler chez les animaux, mais les points limites seront tout signe de souffrance ou de détresse respiratoire, qui feront l'objet d'approfondissement de l'anesthésie ou d'une euthanasie. Toute perte de poids de plus de 20% fera également l'objet d'une euthanasie.

1382- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) résultent de perturbations de la circulation sanguine cérébrale, à l'origine de lésions cérébrales. En France, les AVC représentent la 3e cause de mortalité et la 1ère cause de handicap physique chez l'adulte, et l'incidence risque d'augmenter en raison du vieillissement croissant de la population et de l'absence de traitements efficaces.

Parmi les AVC, 20% sont d'origine hémorragique, par rupture soudaine d'une artère cérébrale, et la majorité (80%) est d'origine ischémique, c'est-à-dire due à l'occlusion d'une artère par un caillot. Après un AVC ischémique (AVCi), le seul traitement disponible est un fibrinolytique, qui permet de restaurer la circulation cérébrale, en détruisant le caillot. Toutefois, cette stratégie n'est pas pleinement satisfaisante, car elle permet de lutter uniquement contre la cause de l'ischémie. De plus, son utilisation est limitée: elle doit être administrée dans les 4h30 après l'apparition des premiers symptômes et elle peut entraîner des complications (hémorragies cérébrales). Il faut savoir qu'aucune des très nombreuses molécules neuroprotectrices chez l'animal n'a franchi le cap des essais cliniques. L'échec de ces stratégies ne visant que les neurones a conduit à réorienter les recherches vers des molécules ciblant cette fois-ci un ensemble de cellules, et notamment celles constituant la paroi des vaisseaux sanguins. Ainsi, l'espoir repose donc sur la découverte de stratégies permettant de protéger un plus grand nombre de cellules différentes. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet est d'évaluer si notre stratégie thérapeutique, en agissant, entre autres, au niveau des cellules de la paroi des vaisseaux, permettrait d'améliorer le pronostic des AVCi. Pour cela, nous travaillerons sur un modèle expérimental d'ischémie cérébrale chez la souris reproduisant la pathologie humaine. Les expériences seront réalisées chez 165 souris dont l'analgésie et l'anesthésie seront monitorées pendant toute l'expérience. La mise en place d'un point limite et l'observation quotidienne du comportement des souris permettront d'identifier toute souffrance et douleur. Ce modèle expérimental est extrêmement reproductible et n'entraîne qu'une très faible mortalité, ce qui en fait un modèle de sévérité modérée. Ces deux éléments permettent de limiter le nombre de souris par groupe. De plus, les souris seront hébergées en groupes sociaux stables, afin de limiter tout stress et modification de hiérarchie. Une partie des travaux de ce projet a déjà été réalisée in vitro. Cependant, les mécanismes impliqués dans les lésions à la suite d'une ischémie cérébrale mettant en jeu différentes cellules et molécules, il est indispensable d'associer aux études in vitro des études chez l'animal vivant.

1383- Les maladies métaboliques sont en constante augmentation. Cette progression est inquiétante car l'obésité et le diabète, en plus d'être des pathologies invalidantes, constituent un facteur de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires et de certains cancers. De plus en plus d'arguments démontrent que le système circadien, qui synchronise notre physiologie avec le rythme jour/nuit, est intimement lié à l'homéostasie métabolique. Des données épidémiologiques montrent par exemple que des altérations du système circadien causées par le travail en horaires décalés (17 % de la population active en France) s'accompagnent de désordres métaboliques. Chez l'animal, des mutations des gènes de l'horloge circadienne conduisent à des anomalies métaboliques. Notre équipe s'attache à identifier les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques par lesquels l'horloge circadienne contrôle le métabolisme. Chez la souris, l'horloge circadienne utilise la protéine KLF10 également présente chez l'homme, pour réguler la rythmicité du métabolisme hépatique. Les souris mâles dépourvues de KLF10 ont une augmentation de la production hépatique de glucose et une hyperglycémie, situation qui

peut conduire à des désordres métaboliques plus importants. Pour comprendre avec précision le rôle de régulateur circadien du métabolisme hépatique par la protéine KLF10, le projet vise 2 objectifs complémentaires : (1) Déterminer le rôle de KLF10 dans le contrôle rythmique du métabolisme des glucides et de lipides spécifiquement dans le foie, qui est un organe majeur pour ces processus et (2) Déterminer les conséquences physiopathologiques résultant de l'altération des liens horloge circadienne-métabolisme dépendants de KLF10. Ce projet de physiologie repose en partie sur des expérimentations chez la souris car (1) son système circadien et sa régulation du métabolisme est proche de celui de l'homme, (2) le système circadien opère à l'échelle de l'organisme entier, en particulier via une synchronisation par les hormones et la température corporelle et le métabolisme est régulé in vivo par de nombreuses interactions entre les organes, (3) des modèles génétiques sont déjà disponibles. Pour l'ensemble des procédures prévues, 300 souris seront utilisées sur une durée de 3 ans. Ces animaux seront par exemple soumis à des mesures de rythme d'activité locomotrice ou de prise alimentaire, des tests de tolérance au glucose ou encore nourris à des horaires décalés. Une recherche bibliographique approfondie a été effectuée afin de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés par d'autres chercheurs. Dans le but de respecter au maximum la règle des 3Rs et afin d'éviter toute souffrance ou angoisse des animaux, nous mettons en oeuvre les éléments de raffinement (enrichissement du milieu, culture), de réduction (méthodes sensibles et à haut débit, constitution d'une banque d'échantillons) et de remplacement (culture cellulaire pour certaines expériences ne nécessitant pas d'interactions physiologiques) appropriés, et nous recourons à des points limites précoces et adaptés (contrôle quotidien de l'activité, valeur de glycémie, perte de poids).

1384- L'objectif de ce projet est de valider la fonction d'un dispositif médical implantable. d'encapsulation de cellules sécrétrices d'insuline, pour le traitement du diabète de type 1. Ce dispositif repose sur la protection de cellules sécrétrices d'insuline par encapsulation, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur ne sera nécessaire.

Une partie des tests précliniques doivent avoir lieu sur le petit animal, sans possibilité de recours à des méthodes alternatives. Il s'agira donc de déterminer la biofonctionnalité des dispositifs remplis avec différents types de cellules sécrétrices d'insuline. Les résultats attendus de ce protocole devraient nous permettre de valider et optimiser l'efficacité du dispositif chez le petit animal avant de passer sur le gros animal et ainsi limiter le nombre de gros animaux nécessaires pour la suite des études précliniques. Pour notre protocole, nous avons choisi le rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Ainsi, des dispositifs d'encapsulation seront implantés chez des rats mâles (lignée : Wistar) diabétiques pour une durée de deux semaines. Ce délai laisse à l'animal le temps de cicatriser et permet le développement de vaisseaux sanguins autour du dispositif. Une fois ce délai écoulé, des cellules sécrétrices d'insuline sont injectées dans le dispositif via des chambres implantables et des cathéters placés en sous-cutanée. Les cellules vont alors réguler de manière autonome et physiologique la glycémie de l'animal. Le dispositif implanté sera identique pour l'ensemble des groupes expérimentaux, mais différents types de cellules seront injectées : îlots pancréatiques de rat, de porc et cellules beta génétiquement modifiées d'origine humaine. Afin d'obtenir une meilleure régulation de la glycémie avant l'injection des cellules dans le dispositif, des pompes osmotiques délivrant de l'insuline en continu sont implantées sous la peau des rats diabétiques, puis enlevées après l'injection des cellules. Pour chaque groupe expérimental 10 rats diabétiques seront utilisés pour chaque temps d'étude, afin d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques et valider l'étude. Au total, 150 rats diabétiques seront implantés, ce qui nécessite, au vu des 80% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 180 rats sains. Enfin l'obtention d'îlots pancréatiques de rat nécessitera l'utilisation de 120 rats, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 300. Le respect du principe de raffinement intervient au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer sera respectée. La souffrance des animaux sera réduite au maximum. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire.

1385- Dans le cadre de sa politique environnementale, le Conseil Général a mis en place un programme de relâcher de cistudes d'Europe *Emys orbicularis* dans notre région. Ce programme a été validé en 2006 par le Ministère en charge de l'Ecologie, sous condition que soit mené un suivi scientifique de ces actions de relâcher. Ces actions concernent un prévisionnel de 500 cistudes, issues d'élevages agréés, qui seront lâchées à l'âge de 6-7 ans (subadultes) en plusieurs vagues annuelles sur un site restauré. La responsabilité de ce suivi scientifique a été confiée au laboratoire porteur de la présente demande.

Le projet EMYS-Recherche a pour objectif de répondre à la condition exprimée par le Ministère, en proposant une évaluation des actions de relâcher de cistudes. Les premiers relâchés ont déjà eu lieu avec 37 cistudes libérées en 2013 et 2014.

Concrètement, le projet EMYS-R vise à répondre aux questions suivantes :

- Comment les cistudes issues d'élevages s'acclimatent-elles à leur nouveau milieu naturel ? en d'autres termes, quel est le taux de survie des cohortes relâchées, et quels comportements les individus adoptent-ils pour exploiter avec succès leur milieu ?

- Quel est le devenir de la population de cistudes relâchées ? en d'autres termes, quel est le taux d'installation et/ou de dispersion des individus, quel est leur succès reproducteur, quel est le taux de survie de leur progéniture et quelle est in fine la dynamique de la population ?

Cette évaluation implique un suivi à long terme, ce qui justifie la durée du projet à 5 ans.

Concrètement, nous proposons de mettre en place un protocole standard de captures/marquages/recaptures pour assurer le suivi démographique énoncé plus haut. Cette CMR sera combinée à un suivi standard de l'état de santé, de la biométrie, du régime alimentaire et du statut reproducteur des individus ainsi qu'à un suivi comportemental basé sur l'observation directe et la pose d'émetteurs/enregistreurs ultra-miniaturisés sur les animaux évoluant librement dans leur milieu.

Le protocole intégrera la règle des 3 R : la Réduction des effectifs sera assurée en ajustant (a priori à la baisse) les efforts de piégeage en fonction des succès cumulés des captures de l'année ; de la même manière, la Réduction du nombre de manipulations sera assurée en ne manipulant (biométrie, prélèvements) les animaux qu'à leur première capture de l'année, les éventuelles captures successives sur une même année permettant d'apporter l'information de base concernant leur survie et leur position géographique (et éventuellement la récupération du matériel précédemment déployé) ; enfin, le Raffinement du protocole sera assuré en tenant compte des caractéristiques des individus, en particulier leur statut reproducteur qui devrait évoluer au cours du temps (les individus relâchés sont subadultes) et qui nécessite des précautions de manipulation supplémentaires chez les adultes et les nouveau-nés. Compte tenu de la nature du suivi, le Remplacement n'est pas applicable dans cette étude.

En précisant les capacités d'acclimatation, d'installation, de dispersion et de reproduction de la cistude dans notre région, en lien avec les habitats naturels et restaurés sur le site du relâché et ses alentours, cette étude constituera une base scientifique d'aide de prise à la décision en termes de gestion des espaces et des espèces à destination des institutions locales et des autres programmes de renforcement et de réintroduction de l'espèce en cours en France et en Europe.

1386- Les scientifiques prédisent, qu'en raison du changement climatique, les sécheresses deviendront de plus en plus intenses dans le future, ce qui provoquera une réduction de la disponibilité des aliments et influencera la physiologie des animaux. De nombreuses études portant sur les humains ont montré une influence significative des stressseurs environnementaux sur la cognition. Chez les animaux en revanche, bien que les études menées depuis des dizaines d'années en conditions idéales de captivité aient révélé des capacités cognitives impressionnantes, l'impact du stress environnemental sur la cognition reste méconnu. Et pourtant, l'amplification du stress environnemental provoqué par le changement climatique découlant des activités humaines, pourrait altérer les capacités cognitives des animaux sauvages, notamment leurs réponses face aux prédateurs, leur intelligence sociale ou leurs prises de décision. La probabilité d'extinction des espèces pourrait alors être significativement augmentée. Etonnamment, les scientifiques ne se sont jamais penchés sur cette thématique. En règle générale, les étudiants en cognition peu d'expérience en physiologie tandis que les étudiants en physiologie considèrent rarement la cognition. Nous allons donc étudier comment les performances des animaux lors de tâches cognitives (sur l'attention, la mémoire spatiale) sont influencées par leur statut physiologique. Nous étudierons la souris rayée, une espèce vivant dans un habitat semi-désertique caractérisé par de longues sécheresses en été. Nous étudions cette espèce sur le terrain depuis 2001 et, dans un objectif de comparaison directe, nous planifions de réaliser des expériences similaires à celles incluses dans ce projet sur des animaux sauvages. Grâce aux études menées sur le terrain, nous savons que les taux de sucre circulants et les taux d'hormones telles que la testostérone, la corticostérone et la prolactine diminuent au cours de la saison sèche. Nous mettrons au point différents tests cognitifs dans un labyrinthe. Afin d'étudier l'influence du taux de sucre circulant sur le comportement, nous abreuverons les souris avec des solutions sucrées. Par ailleurs, nous augmenterons ou diminuerons expérimentalement les taux d'hormones à l'aide d'implants spécifiques. Enfin, nous maintiendrons certaines souris en condition de restriction alimentaire afin de mimer la diminution de la disponibilité des aliments au cours de la saison sèche. Ce projet nous permettra de comprendre l'impact du statut physiologique d'un individu sur les traits cognitifs qui sont essentiels pour sa survie. Au total, 864 animaux seront utilisés. La règle des 3 R's sera respectée. Les animaux seront surveillés quotidiennement et plus particulièrement, 7 heures après le début du jeûne à 16 heures et le lendemain matin à 9 heures. Au moindre signe de souffrance, l'expérience sera arrêtée et les animaux nourris. Les souris des procédures 1 et 2 seront pesées 3 fois par semaine. Si la perte de poids est supérieure à 20%, l'expérimentation sera abandonnée et les animaux nourris normalement. Les souris de la colonie seront pesés chaque jour. Au moindre signe de souffrance physique (plaies dues à des agressions...), les souris seront mises à mort. Les souris sont élevées avec leurs deux parents, et ce jusqu'à la naissance de la 4ème portée. Après le sevrage de la 4ème portée, le couple reproducteur sera euthanasié afin d'éviter d'autres épisodes de reproduction et leurs jeunes seront maintenus en fratries unisexes jusqu'à leur utilisation à des fins expérimentales. Dans ces conditions, il est rare que des conflits éclatent au sein des fratries. Il s'agit là d'une différence notoire avec les souris domestiques dont les frères ne peuvent être conservés en fratrie au-delà de trois mois. Les souris utilisées ou produites dans une expérience pourront être utilisées dans une autre expérience si leur histoire expérimentale est compatible avec la question scientifique posée. Dans le cas contraire les souris seront euthanasiées.

1387- Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Les principales approches de traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récurrence du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur.

En effet, on sait aujourd'hui que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Seulement, de nombreux mécanismes suppresseurs déjouant la surveillance du système immunitaire ont été mis en évidence lors du

développement des tumeurs. Ces mécanismes présents physiologiquement deviennent indésirables quand il s'agit d'éliminer les cellules tumorales puisqu'ils régulent le système immunitaire, ce qui conduit à un développement tumoral non contrôlé.

Parmi ces mécanismes suppresseurs, on distingue des populations suppresseuses (Treg, MDSC) ou des récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4). Certaines de ces molécules sont déjà des cibles thérapeutiques dans quelques essais cliniques pour certains cancers. Ces essais ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins.

Nous souhaitons tout d'abord examiner dans le développement tumoral le rôle d'un gène : SIRPalha exprimé par les MDSC et macrophages, pour lequel existe des souris exprimant la protéine SIRPalha mutante (SIRP α mut). Nous posons l'hypothèse que ce gène participe à des mécanismes permettant l'échappement tumoral.

D'un point de vue thérapeutique, nous proposons de traiter les animaux avec des traitements expérimentaux ciblant le système immunitaire.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies combinées chez la souris. Le nombre d'animaux utilisé sera de 1080 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfourer et se cacher.

1388- *Mycobacterium ulcerans* est une mycobactérie responsable de l'ulcère de Buruli. Elle provoque des atteintes cutanées principalement au niveau des membres inférieurs chez les sujets jeunes qui séjournent près des zones humides. Cette infection qui a été classée par l'OMS comme maladie tropicale négligée sévit dans les régions tropicales et subtropicales du continent africain, sud-américain, en Asie parmi une population touchée par la pauvreté. Un traitement par antibiothérapie associant la rifampycine et la streptomycine a démontré son efficacité mais il se heurte à plusieurs obstacles : la disponibilité, le coût et les contrefaçons de médicaments particulièrement nombreuses sur le marché africain.

Mycobacterium marinum est une mycobactérie qui vit dans le milieu aquatique (eau douce et eau salée). Elle provoque chez les poissons la tuberculose du poisson. Chez l'homme, c'est un pathogène opportuniste qui est responsable dans le continent européen de la maladie des aquariums ou maladie des piscines et en Afrique de granulomes par transmission du poisson à l'homme. Cette maladie est caractérisée par l'apparition de chapelets de lésions polymorphes (papule, nodule, ulcère) au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Une infection généralisée peut survenir chez les individus immuno-déprimés tandis que chez l'individu immunocompétent la maladie évolue vers la guérison en quelques mois avec des possibilités de séquelles au niveau des tendons et des articulations. Un traitement antibiotique existe mais il se heurte aux mêmes problèmes que dans le cas de l'ulcère de Buruli.

Le bleu de méthylène fait partie de la liste des médicaments essentiels éditée par l'OMS. Une étude préliminaire in vitro menée dans notre laboratoire a démontré une activité bactériostatique et / ou bactéricide de cette molécule contre ces mycobactéries. Aussi nous envisageons une application thérapeutique sous forme de badigeonnage des lésions et/ou injection.

Il n'y a pas de modèle in vitro capable de mimer le tissu cutané humain aussi le modèle animal est incontournable. Le modèle murin de ces infections est largement décrit dans la littérature scientifique aussi notre projet consistera à tester in vivo sur des souris BALB/c cette molécule. En effet dans le cas d'une infection, tous les acteurs de l'immunité de l'organisme entier interviennent sur le lieu de la lésion avec en particulier un recrutement de cellules de l'immunité (macrophages, lymphocytes T et B...)

Conformément au modèle décrit dans la littérature, nous induirons une infection cutanée par injection intradermique au niveau du dos. Dès l'observation des lésions nous appliquerons le traitement : badigeonnage et/ou injection. Nous testerons cette molécule sur 1 souche de *M. ulcerans* et en cas de succès sur 1 souche de *M. marinum*. Nous utiliserons un total de 80 animaux : 40 animaux par souche (20 mâles et 20 femelles) à raison de 5 animaux de même sexe par cage qui seront enrichies par du matériel de construction de nid.

Les manipulations seront effectuées dans un laboratoire de sécurité biologique de classe 3.

1389- Le virus de la Nécrose Hématopoïétique infectieuse (vNHI) est responsable d'une maladie piscicole sévère dans les élevages de salmonidés (truites Arc-En-Ciel et saumons principalement) mais également dans le milieu sauvage. Cette maladie fait partie des maladies réputées contagieuses définies par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE).

Dans un premier temps identifié sur le continent américain, le virus de la NHI est devenu endémique dans les années 1970s en Alaska puis sur toute la côte pacifique des Etats-Unis, avant de faire son apparition en Asie puis en Europe dans les années 80. Cinq génotypes ont été décrits dans la littérature, généralement associés à la répartition géographique du virus. En 2013, une technique de biologie moléculaire (RT-PCR quantitative) permettant de détecter les souches de vNHI appartenant à ces 5 génotypes a été décrite dans la littérature. L'OIE recommande, dans son manuel de diagnostic des maladies aquatiques, l'utilisation de cette technique en parallèle de la technique officielle pour la recherche du virus de la NHI (culture cellulaire et identification par immunofluorescence). Un projet d'évolution de la réglementation Européenne encadrant la surveillance des maladies listées des poissons d'élevage prévoit également de rendre officielle, à court terme, ce type d'outils moléculaires pour la recherche du vNHI.

En complément de ces méthodes directes ciblant le virus, les méthodes sérologiques indirectes visent à détecter la présence d'anticorps spécifiques d'un virus et permettent de qualifier le statut sanitaire d'un élevage. Les objectifs de ce projet sont i)

de valider une technique de détection par qPCR du virus de la NHI dérivée de celle décrite en évaluant sa spécificité et sa sensibilité et ii) de finaliser la validation d'une méthode de détection des anticorps anti-vNHI par séroneutralisation. Une épreuve infectieuse expérimentale sera réalisée sur des truites arc en ciel juvéniles de l'élevage indemne du laboratoire. Elle consistera à déterminer les profils de virulence d'une dizaine d'isolats viraux en suivant la mortalité induite après contamination des animaux par balnéation. Des prélèvements d'organes cibles réalisés sur les poissons morts seront utilisés pour vérifier la spécificité et sensibilité diagnostiques de la méthode de qPCR à valider, et des prélèvements sanguins seront réalisés sur les poissons qui ont survécu pour valider la spécificité de la séroneutralisation. Au total, 2400 poissons (étude de 15 isolats de vNHI) seront utilisés dans le cadre de ce projet. Toutes les expérimentations se feront dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement et des méthodologies pour réduire la douleur chez le poisson.

1390- L'IL-15 est une cytokine, proche de l'IL-2, impliquée dans le développement des cellules T CD8+ et NK. L'IL-15 est une cytokine pro-inflammatoire produite à de fortes concentrations dans différentes pathologie (polyarthrite, maladie de Crohn, rejet de greffe...). Notre laboratoire a ainsi développé un antagoniste de l'IL-15, qui est un inhibiteur efficace et spécifique sur la prolifération des cellules in vitro. Cet antagoniste est composé de la partie Fc d'un anticorps fusionnée à deux molécules d'IL-15 mutées. L'avantage attendu de cette molécule est d'occuper les récepteurs à l'IL-15 à la surface des cellules immunitaires afin d'inhiber son action. Le but est de proposer une nouvelle approche thérapeutique pour les maladies inflammatoires comme la polyarthrite ou le rejet de greffe.

A ce stade, nous connaissons son effet in vivo sur le développement des cellules NK et lymphocytes CD8+ et les doses efficaces chez des souris saines car nous avons déjà mesuré les paramètres d'élimination et analysé les mécanismes immunitaires mis en jeu. Nous avons ensuite évalué le potentiel thérapeutique de cette approche sur un modèle inflammatoire d'arthrite induite par le collagène de type II chez les souris DBA/1 sur lequel nous avons eut de bons résultats.

Pour étendre les applications de notre antagoniste à l'inhibition de rejet de greffe. Nous avons démontré dans une expérience in vitro de "Mixed Lymphocyte Reaction" son efficacité à inhiber la réaction de rejet de greffe. Nous avons alors mis en place une collaboration pour confirmer cette aptitude in vivo par des expérimentations d'inhibition de rejet de greffe d'ilôt de Langerhans. Là encore, l'antagoniste a montré sa capacité à augmenter la survie des souris.

Devant ces multiples preuves d'efficacité, nous souhaitons réaliser un test de rejet de greffe d'un organe complet pour finir de démontrer son efficacité chez la souris. Nous en profiterons pour continuer l'étude des mécanismes en jeu. Nous avons choisi d'utiliser un test de rejet de greffe de peau pour sa facilité de mise en place et son caractère peu invasif. Cette technique consiste à prélever des fragments de peau d'une souris balb/c sacrifiée et de les greffer sur le flan de souris non immuno-compatible (C57bl/6). La mise en place de la technique de greffe proprement dite se fera sur quelques souris (5 à 10) destinées à l'euthanasie. Celles-ci seront donc sacrifiées dès que le geste chirurgical est terminé.

Dans un premier temps, nous mesurerons l'effet de l'antagoniste sur ce modèle (60 souris prévues). Nous utiliserons également cette première série pour réaliser le suivi des populations immunitaires circulantes au cours du temps. Si aucun effet bénéfique n'est observé, ce projet s'arrêtera dès le premier essai.

Dans un second temps, nous réaliserons une série d'expérimentation pour étudier les mécanismes immunitaires locaux lors de la phase critique où les groupes contrôles commencent à rejeter le greffon alors que les groupes traités le tolèrent (60 souris).

Prise en compte de la règle des 3R :

Remplacement : Comme expliqué précédemment, nous souhaitons apporté une solution permettant de retarder le rejet de greffe. Nous avons démontré son efficacité dans un modèle in vitro. La poursuite de ce projet passe donc impérativement par la validation de ces résultats par un modèle animal.

Réduction : Si la première expérimentation montre que la molécule testée est inefficace, le projet sera stoppé.

Raffinement : La greffe de peau est une procédure légère. L'intervention se fait sur des animaux anesthésiés. La douleur sera contrôlée par l'injection d'AINS pendant 3 jours à partir de l'opération, puis, durant les 48h de la phase de rejet prévue 8 à 10 jours après la greffe pour les groupes contrôles.

Si des animaux montrent des signes de souffrance non traités par l'AINS, ils seront sacrifiés.

1391- L'objectif de ce projet est d'évaluer une nouvelle approche pour mettre en évidence une exposition à des antibiotiques dans la filière des poules pondeuses et de détecter des pratiques non autorisées par des méthodes d'analyse non ciblées. La recherche de traitements non autorisés se fait le plus souvent par la recherche de résidus de la molécule administrée ou de son métabolite, on parle alors de recherche ciblée. Depuis quelques années, les recherches scientifiques s'orientent vers des recherches de type « métabolomique » avec l'étude des empreintes métaboliques d'animaux après traitement. Le métabolome est constitué de l'ensemble des petites molécules, les métabolites, tels que les intermédiaires métaboliques, les hormones et autres molécules signal ainsi que les métabolites secondaires, qui peuvent être trouvées dans un échantillon biologique.

Les Céphalosporines de 3ème et 4ème générations sont considérées comme particulièrement importantes en médecine humaine car elles constituent une des seules alternatives pour le traitement de certaines maladies infectieuses chez l'homme. Selon les recommandations européennes, ces antibiotiques doivent ainsi être réservés au traitement curatif en deuxième intention chez l'animal. Dès 2006, nous avons été informés de la nécessité de réduire l'utilisation des antibiotiques à titre préventif et de la nécessité de surveiller en particulier cette famille d'antibiotique et les résistances qui leur sont associées. Or, il y a actuellement peu de contrôle des antibiotiques dans la filière des poules pondeuses et en particulier dans l'oeuf. L'usage

des céphalosporines n'est pas autorisé dans la filière volaille et ces dernières ne devraient donc pas être retrouvées. Une approche quantitative n'est donc pas indispensable et la mise en évidence d'un traitement éventuel par ces molécules par comparaison des profils métaboliques est intéressante. La persistance dans la durée de ces modifications du métabolome peut être un atout supplémentaire dans la détection de pratiques non autorisées ou dans la détection du mésusage des médicaments.

Deux molécules de la famille des céphalosporines (ceftiofur et cefquinome) seront incluses dans l'étude. Les matrices étudiées seront les suivantes: plasma, muscle, foie, fèces et oeufs. Seule une expérimentation sur animaux (poules domestiques) peut permettre d'obtenir l'effet à évaluer, c'est-à-dire une modification significative du métabolome dans les matrices étudiées après traitement par des céphalosporines. En effet, aucune manipulation *in vitro* ne permet de mimer ces modifications complexes et globales du métabolisme dans les différentes matrices étudiées. Le nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour être en mesure de détecter a été optimisé statistiquement : 6 groupes de 8 poules, soit 48 poules seront utilisées. Aucune pratique invasive n'est prévue excepté l'injection du principe actif par voie intramusculaire. Ce principe actif a déjà été administré par voie intramusculaire à des poules lors d'une précédente étude et nous n'avons pas observé de souffrance des animaux. Il n'a donc pas été prévu de procédure particulière pour réduire la douleur. L'euthanasie aura lieu 48 ou 72h après le début du traitement.

1392- L'utilisation de la souris comme modèle expérimental s'est considérablement accrue ces dernières années avec la création d'animaux modèles génétiquement modifiés. Pour préserver à long terme ces modèles murins qui sont souvent très long à obtenir, il est devenu nécessaire de congeler les lignées (embryons au stade 2 cellules).

L'archivage des modèles murins par la technique de cryoconservation consiste à amener le matériel biologique à très basse température pour permettre sa conservation à long terme, puis après réchauffement par une technique appropriée, de récupérer ce matériel à l'état viable. Les intérêts de la cryoconservation sont multiples et sont à la fois économiques, sanitaires et génétiques.

La congélation des embryons se fait au stade 2 cellules. Ils sont obtenus par accouplement naturel. Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 1800 souris sur 5 ans (1600 femelles et 200 mâles fertiles). Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, l'intérêt majeur de la cryopréservation est de minimiser le nombre d'animaux à l'état respirant en zootechnie. Le nombre d'animaux est prévu au minimum mais si le nombre d'embryons récoltés est suffisant avant d'avoir utilisé tous les lots, le nombre de femelles sera vu à la baisse. Enfin la souffrance et/ou le stress des animaux est uniquement présent au moment des injections hormonales (en intrapéritonéal).

Trois types de contrôles peuvent être effectués c'est-à-dire des tests *in vitro* et des tests *in vivo*.

- Test *in vitro* : décongélation de paillettes par lot de congélation et suivi de leur développement jusqu'au stade blastocyste (60 à 80 % de blastocystes obtenus).

- Test *in vivo* : réimplantation d'embryons décongelés pour chaque lignée afin d'évaluer la capacité à obtenir des nouveaux-nés (au moins 2 nouveau-nés obtenus, dont 1 positif).

- Reviviscence de la lignée : Il s'agit de faire repartir la lignée sous sa forme respirante : les embryons sont décongelés et réimplantés dans l'infundibulum de femelles pseudo-gestantes. Après sélection par génotypage, les animaux seront transférés dans le service de zootechnie dont dépend le client.

Au sein de notre service uniquement les tests *in vitro* sont réalisés (le personnel est en formation sur les contrôles *in vivo* et la reviviscence). Ces procédures feront l'objet d'un projet différent.

1393- Notre groupe de recherche s'intéresse aux pathologies du tissu adipeux induites par une mutation sur le gène LMNA codant pour les lamines de type A. Les patients porteurs de la mutation p.R482W du gène LMNA présentent une lipodystrophie familiale partielle de Dunnigan (FPLD2) caractérisée par une lipoatrophie avec redistribution facio-cervicale du tissu adipeux, une insulino-résistance, une hypertriglycéridémie et une athérosclérose précoce. Nous avons posé l'hypothèse d'un défaut de différenciation adipocytaire chez ces patients. Afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans ce défaut de différenciation, nous avons reprogrammé des cellules de peau de ces patients et de sujets sains en cellules souches à pluripotence induite (iPS).

Nous avons mis au point un nouveau protocole permettant la différenciation d'adipocytes à partir d'iPS. Ce protocole permet d'obtenir des précurseurs adipocytaires ayant la capacité de se différencier en adipocytes de type beige *in vitro*, c'est à dire ayant une capacité thermogénique en réponse au froid ou aux agonistes β -adrénergiques. L'objectif de ce protocole est de (i) montrer que les cellules obtenues *in vitro* à partir des iPS issues de sujets sains ont la capacité de former un tissu adipeux *in vivo* après une injection sous-cutanée dans un modèle de souris athymique (ii) démontrer que les adipocytes du tissu neoformé conservent *in vivo* leur phénotype beige lorsqu'on stimule les souris par un agoniste β -adrénergique (iii) explorer la capacité de différenciation *in vivo* et le potentiel thermogénique des adipocytes issus des iPS mutées.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 144 souris expérimentales NMRI Nude pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le modèle iPS concerné. Il n'est pas possible de créer *in vitro* la complexité de tous les acteurs cellulaires mis en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, les procédures expérimentales mises en œuvre sont considérées comme peu invasives (Classe légère). Cependant, en cas de signes de souffrance constatés lors des observations régulières des animaux, nous procéderons à l'arrêt des expériences.

De plus, les animaux sont hébergés selon les règles et recommandations en vigueur avec un accès à l'eau et la nourriture ad libitum ainsi que d'un enrichissement du milieu adapté tout au long de leur vie.

1394- Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) qui consiste en l'obstruction des voies aériennes lors du sommeil, est une pathologie très fréquente, puisqu'elle concerne jusqu'à 17% de la population, et dont les conséquences sont très graves (infarctus, diabète, troubles de la vigilance ...). Ces apnées induisent une diminution cyclique du taux d'oxygène dans le sang appelée hypoxie intermittente (HI). En termes mécanistiques, la recherche clinique et la recherche chez l'animal ont identifié que cette HI était responsable des maladies associées au SAOS.

A l'heure actuelle, le seul traitement qui existe, consiste à porter un masque qui souffle de l'air dans les voies aériennes afin de supprimer les obstructions et éviter les apnées. Cependant, les patients ont du mal à le porter toute la nuit du fait de la gêne occasionnée, et toutes les conséquences graves des apnées ne sont pas améliorées par ce traitement.

Il est donc important de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement des maladies associées pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients en proposant des traitements complémentaires ou alternatifs au port du masque, comme l'exercice musculaire. Les animaux, comme la souris, hébergés sans contrainte supplémentaire, peuvent, grâce à un dispositif parfaitement adapté, être exposés à l'hypoxie intermittente pour reproduire la pathologie humaine.

Parmi les maladies associées au SAOS, le diabète de type 2 est une des pathologies les plus importantes avec une prévalence de 30% de diabétiques chez les apnéiques. Ainsi, par simple mesure de la glycémie et de l'insulinémie, nous proposons d'explorer des mécanismes qui induisent un diabète chez des souris exposées à l'HI ainsi que d'étudier les effets bénéfiques de l'exercice musculaire sur ces troubles.

Pour répondre à cet objectif, nous utiliserons plusieurs modèles murins (336 souris au total) dont des animaux normaux, des animaux transgéniques ainsi que des animaux soumis à un régime gras afin de générer une obésité. L'utilisation des animaux reste essentielle pour étudier la résistance à l'insuline au niveau global ainsi que l'impact au niveau des différents organes. Ainsi de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés au strict minimum, les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les différentes analyses in vivo, ainsi que pour les prélèvements et l'analyse tissulaire. Par ailleurs, le bien-être des animaux sera une priorité tout au long des expérimentations, et chaque étape expérimentale ainsi que la mise à mort sera réalisée dans les conditions les plus acceptables possibles, en veillant à minimiser au mieux le stress des animaux.

1395- La tuberculose (TB) est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Parmi les axes principaux de recherche dans cette pathologie figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la mycobactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin plus efficace que le vaccin actuel, le BCG. Notre équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans cette pathologie, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb. La spécificité de notre travail est de mettre en interaction des hôtes cellulaires ou animaux avec des souches mycobactériennes chacun portant ou non des déficiences particulières. Cette approche nous a permis d'identifier des cibles d'actions potentielles sur les mycobactéries ou l'hôte ainsi que des candidats vaccins. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre et vise à étudier l'interaction hôte-Mtb dans des modèles murins présentant des sensibilités différentes à l'infection, après traitement ou après des modifications génétiques conduisant à des déficits dans des réponses immunitaires dont nous souhaitons évaluer l'impact lors de l'infection par Mtb. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (survie, charges bactériennes, histologie) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires). Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 370 souris Balb/c, 27 souris possédant une mutation ciblée sur un gène de la réponse des opioïdes endogènes. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

Tout d'abord, les expériences réalisées font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et s'avèrent suffisamment prometteuses pour utiliser le modèle intégré murin.

Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon).

Finalement, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) dans la constitution de certains modèles animaux reposant sur la technique des chimères hématopoïétiques (nécessitant une irradiation des animaux puis une phase de reconstitution immunologique pendant laquelle les animaux sont sensibles aux infections) et ii) lors de

l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

1396- La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive profonde de la vision ou une cécité. Aucun traitement n'est disponible à l'heure actuelle. Le but de notre étude est de pouvoir proposer une solution thérapeutique aux patients atteints de RP afin de prévenir l'évolution de la maladie et de leur permettre de conserver la vision via les photorécepteurs à cône. L'équipe a identifié que le gène *Nxn1* code pour un facteur qui serait impliqué dans la survie des photorécepteurs à cônes, le RdCVF « Rod-derived Cone Viability Factor ».

Le but de cette étude est de tester le bénéfice de la transplantation de photorécepteurs sains sur la dégradation secondaire des photorécepteurs à cône. Nous comparerons le bénéfice obtenu en transplantant à des souris *rd1*, modèle murin de rétinopathie pigmentaire couramment utilisé en science, des photorécepteurs issus de souris sauvages (*Nxn1*^{+/+}) vs de souris déficientes en RdCVF (souris *Nxn1*^{-/-}).

Les animaux seront transplantés à 8 jours post-natal (PN8) et seront euthanasiés à PN42. Les yeux seront alors prélevés pour études histologiques et biochimiques. Au total 60 animaux seront transplantés (30 avec les photorécepteurs issus de souris *Nxn1*^{+/+} et 30 avec les photorécepteurs issus de souris déficientes en RdCVF, *Nxn1*^{-/-}).

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

1397- Les traitements médicamenteux actuels utilisés en oncologie reposent sur l'utilisation de molécules dites à « fenêtre thérapeutique étroite » : l'écart entre la dose efficace et la dose toxique est très faible. Dans la pratique médicale, il est délicat de viser cette fenêtre thérapeutique, notamment du fait de la grande variabilité inter-patient de la capacité à dégrader ces molécules. Un patient à forte capacité métabolique pour la molécule d'intérêt risque de la dégrader au point de passer en-deçà de la dose efficace et de ne pas bénéficier du traitement. Au contraire, un patient à faible capacité métabolique risque de subir une surdose et une toxicité importante qui peut mener à l'arrêt du traitement.

L'objectif de ce projet est d'améliorer l'efficacité du traitement et d'en réduire la toxicité en ouvrant cette fenêtre thérapeutique : en modifiant la biodisponibilité (=répartition dans le corps en fonction du temps) de la molécule thérapeutique, grâce à l'utilisation d'un nano-objet.

Il s'agit d'étudier l'efficacité anti-tumorale et la toxicité induite par la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) au regard de la molécule thérapeutique seule (traitement de référence utilisé chez les patients). Le nano-objet est une nanoparticule organique issue de la nanotechnologie. Il est synthétisé avec des matières premières approuvées par la FDA. La molécule thérapeutique utilisée pour ce projet est le paclitaxel issu de la famille des médicaments anti-cancéreux.

Tout d'abord, une première procédure sera menée sur des souris porteuses de tumeur (des cellules tumorales auront été injectées sous la peau au préalable) afin d'évaluer l'efficacité anti-tumorale et la tolérance au traitement de la composition thérapeutique (en présence du nano-objet). L'efficacité sera déterminée par le retard de croissance tumorale induit par la composition thérapeutique, en comparaison avec le traitement de référence. Le traitement consiste en 5 à 10 injections et le retard de croissance tumorale sera mesuré pendant un mois.

Si l'efficacité et la tolérance peuvent être démontrées, de nouveaux groupes de souris seront xenogreffés afin de confirmer l'apport de la composition thérapeutique et d'en préciser l'impact sur la biodistribution du produit. L'étude de biodistribution quant à elle, évaluera l'accumulation de la composition thérapeutique, toujours en comparaison avec le traitement de référence, dans la tumeur ainsi que dans les organes et tissus sains.

Dans sa globalité, le projet nécessitera 71 souris : 41 pour la première phase, puis 30 si la première phase apporte des résultats concluants. Ce genre d'étude de cancérologie menée sur des animaux vivants ne peut être remplacée par des études *in vitro* car la biodistribution du produit ne peut être décrite que sur un organisme complet et que l'action des agents thérapeutiques intervient conjointement aux différents systèmes de lutte contre les maladies de type tumoral (notamment immunitaire). Les animaux bénéficieront de contrôles quotidiens et de traitements antalgiques et l'expérience sera abrégée si la croissance tumorale atteint un volume tel que l'efficacité du traitement est non mesurable ou si leur état général se dégrade de manière conséquente. Les groupes d'animaux sont réduits à leur taille minimale (3 à 5 animaux) pour que l'exploitation des résultats soit possible.

1398- La radiobiologie cherche à potentialiser les effets des rayonnements ionisants (RI), utilisés en radiothérapie sur les tissus tumoraux, et de minimiser au maximum l'impact de ces derniers sur les tissus sains. Effectivement, la difficulté à délimiter exactement une tumeur et les marges nécessaires à prendre au niveau de sa périphérie font que les RI traversent aussi les tissus sains.

La radiothérapie est un outil puissant qui fait partie de l'arsenal de traitements anti-cancéreux. 50% des patients traités pour un cancer reçoivent une radiothérapie au cours de leur traitement. La capacité de la radiothérapie à tuer les cellules cancéreuses réside dans sa capacité à induire des dommages sur la molécule d'ADN. Cependant, les cellules possèdent des mécanismes qui leur permettent de faire face à ses dommages et de les réparer. Le but de notre projet est de combiner des molécules qui empêcheraient cette réparation avec la radiothérapie afin d'augmenter l'efficacité de cette dernière. Nous

souhaitons évaluer ce nouveau type de traitement à l'aide de modèles de cancer du poumon, étant donné qu'il y a eu très peu d'avancées ces dernières années concernant le traitement de ce type de cancer alors que son incidence ne diminue pas.

Si l'irradiation constitue un traitement assez efficace, elle génère également des dégâts dans les tissus sains environnants. Dans le cas d'une irradiation du poumon, un des effets secondaires est le développement d'une fibrose radio-induite. Nous vérifierons donc dans un second temps que la nouvelle combinaison thérapeutique n'aggrave pas la fibrose radio-induite, ce qui limiterait grandement le potentiel de ces nouveaux traitements en clinique.

Le recours à des modèles animaux nous permettra d'étudier les effets de ces nouvelles combinaisons thérapeutiques dans un contexte qui inclut le micro environnement tumoral et qui permet donc l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement naturel. Ces interactions jouant un grand rôle dans les effets de la radiothérapie, il apparaît indispensable d'avoir une évaluation sur un modèle animal pour déterminer exactement les effets de ces inhibiteurs avant d'envisager un passage en thérapie humaine. Aucun modèle *in vitro* ne permet actuellement d'obtenir la complexité présente dans un animal vivant (immunité, vascularisation, organo-dépendance,...).

Pour mener à bien ce projet et avoir une idée précise du potentiel en thérapie humaine de ces nouveaux produits, 480 souris seront nécessaires sur 4 années d'étude. Cette estimation se base sur des analyses statistiques qui permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

Les animaux seront observés quotidiennement pour détecter tout signe éventuel de souffrance ou de toxicité des traitements. Les souris seront hébergées en cages avec 5 souris par cage dans le respect d'un cycle jour-nuit, avec une interdiction de manipuler les souris entre 19h30 et 7h30. Un enrichissement (cocoons de coton) sera introduit dans les cages du début à la fin de l'expérimentation.

1399- Malgré des avancées récentes pour son dépistage et son traitement, le cancer de la prostate reste la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme. Alors que les stades précoces sont généralement traités avec succès, notamment par prostatectomie, l'arsenal thérapeutique pour les formes plus complexes et plus agressives reste très limité. Il existe un réel besoin d'approches thérapeutiques capables de traiter les stades cancéreux à la fois avancés et réfractaires aux thérapies actuelles, ou limitant le recours à une chirurgie invasive potentiellement génératrice d'effets secondaires importants.

Nous avons développé une approche innovante basée sur une technique d'inhibition de gènes qui permet d'analyser l'implication de plusieurs centaines ou milliers de gènes en parallèle, pour de multiples fonctions cellulaires. Nous nous sommes particulièrement intéressés au rôle des kinases, une famille de protéines essentielles pour le contrôle des grandes fonctions cellulaires. Certaines peuvent notamment moduler l'état de prolifération ou de différenciation des cellules, dont la dérégulation est un élément caractéristique du processus de transformation et de cancérisation des tissus.

L'effet de l'inactivation de la totalité des kinases du génome humain a ainsi pu être évalué sur des modèles cellulaires prostatiques humains, représentatifs des différents états de la progression de cette pathologie. Nous avons ainsi sélectionné plusieurs candidats (hits), dont un semble particulièrement prometteur. Nos nombreuses expériences de validation *in vitro* (tests cellulaires) ont en effet montré que l'inhibition de cette kinase inhibe très fortement la prolifération, la viabilité et le caractère agressif des différents modèles cellulaires métastatiques de cancer de la prostate utilisés.

Notre projet consiste maintenant à valider cette nouvelle cible thérapeutique *in vivo* chez un modèle rongeur, pertinent au regard de la littérature existante. En effet, les tests cellulaires *in vitro* ne permettent pas de prédire l'efficacité et l'absence de toxicité de cette approche dans un organisme complexe. Nous proposons d'utiliser un modèle de xéno greffe sous-cutanée de cellules prostatiques cancéreuses humaines. A ce jour, il n'existe pas d'études *in vitro* ou *in vivo* publiées pour cette nouvelle cible thérapeutique.

Afin de réduire au minimum nécessaire le nombre d'animaux sans compromettre la validité des résultats (utilisation de tests statistiques), nous limiterons l'expérience à deux groupes de 5 rongeurs, un groupe traité par inactivation de cette kinase et un groupe contrôle. Après analyse des résultats et en fonction du degré de significativité obtenue, cette expérience pourra être reconduite une fois, portant ainsi le nombre total à 20. Le traitement des animaux se fera sous anesthésie gazeuse afin de limiter le plus possible le stress ou d'éventuelles douleurs occasionnées lors de l'injection des cellules tumorales et du traitement. De plus, la santé des rongeurs sera étroitement surveillée tout au long de l'expérience et l'utilisation d'une grille codifiant le bien-être animal sera mise en place afin d'intervenir au moindre signe d'alerte.

La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Cette approche thérapeutique a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, seulement 20% des patients transplantés restent insulino-indépendants après 5 ans, révélant un échec de la greffe à long terme. De plus, cette perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie.

La phase initiale de la greffe paraît elle aussi délicate, dans la mesure où elle se heurte à 2 obstacles importants :

- le faible nombre d'îlots obtenus à partir d'un pancréas et donc la nécessité de recourir à plusieurs donneurs,
- la perte cellulaire importante des îlots à l'implantation (réaction inflammatoire, stress oxydant et défaut secondaire de vascularisation).

Ainsi, le but de notre recherche, dans lequel s'inscrit cette saisine, est d'améliorer la survie des îlots pancréatiques pré et post implantation en nous focalisant sur :

- la compréhension des mécanismes impliqués dans la perte des îlots pancréatiques au cours des procédures d'isolement et de culture afin de diminuer les effets délétères de l'isolement, d'améliorer les conditions de survie de l'îlot post-isolement en culture et de proposer des modifications de procédure.

- l'identification des mécanismes cellulaires à l'origine des difficultés d'implantation initiale des îlots (stress oxydant et IBMIR) et du défaut d'angiogenèse de ceux ci afin de développer de nouvelles stratégies d'optimisation spécifiques répondant à ces mécanismes.

Après validation, ces modifications seront appliquées sur l'isolement d'îlots de porc et d'îlots humains à visée scientifique.

Nous avons pour objectif d'étudier certaines étapes de la procédure, la première étant l'extraction des îlots, la seconde la culture et la troisième la transplantation. Par ailleurs, l'ensemble des informations qui seront récoltées nous seront essentielles pour la mise au point d'un pancréas bio artificiel (Projet BIOSID, financement européen dans le cadre du FP7).

Ainsi, l'objectif de cette saisine est d'obtenir des îlots pancréatiques de Rat qui représentent la source cellulaire nécessaire et indispensable pour l'identification et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliquées dans la perte des îlots pancréatiques pré et post transplantation. Ces études in vitro, nous permettront d'améliorer les procédures d'isolement des îlots et de développer des stratégies d'optimisation de leur survie post-greffe chez le patient diabétique.

Le rat est le modèle de choix pour ce type d'étude, car l'homogénéité des souches est importante pour déterminer des tendances et est le modèle d'étude standard. De plus, les isolements de rats sont 100 fois moins onéreux que les isolements d'îlots de porc ou d'humain. Pour cela, nous travaillerons sur le modèle de Rat Wistar mâle à raison de 5190 rats sur les 3 ans de la demande.

La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques. La souffrance des animaux sera réduite au maximum. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire.

1400- Les effets des pesticides sur la santé humaine sont devenus aujourd'hui une question importante. Nous émettons l'hypothèse que les facteurs environnementaux et précisément les pesticides, peuvent avoir un impact sérieux sur les mécanismes épigénétiques et pourraient modifier l'expression des gènes dans les cellules germinales, entraînant une fertilité réduite. Notre travail consiste à étudier la différenciation des cellules germinales qui permet la production des gamètes chez les mammifères, dont l'homme, par des techniques de biologie moléculaire et cellulaire.

Pour valider notre hypothèse, nous utiliserons la souris comme modèle animal. Nous étudierons les effets de 3 pesticides chez les souris adultes et sur les descendants des souris femelles traitées. Pour chaque pesticide testé (chlorpyrifos, methoxychor et glyphosate), plusieurs groupes d'animaux seront constitués: Groupes « contrôles » et plusieurs groupes « traités ». Les pesticides seront administrés par voie orale à des doses différentes. Pour ces études, 1800 animaux seront traités et parmi eux, 1344 animaux seront utilisés pour les analyses biologiques ultérieures. Le nombre d'expériences minimal est de deux. La répétition est nécessaire car les variations d'un animal à l'autre augmentent l'écart type et conduisent à des difficultés d'interprétations des données. La méthode statistique envisagée est celle du test de Student (test paramétrique) si les groupes fournissent des valeurs de distribution normale et de variances homogènes ; Sinon, des tests de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney seront effectués (non paramétriques) (Réduction).

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