



**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 (6)

501- Dans les arrêts cardiaques, le refroidissement précoce de l'organisme a été décrit depuis une quinzaine d'années comme protecteur pour les tissus à forte consommation d'oxygène (notamment le cerveau) qui sont les plus sensibles à l'ischémie.

Malheureusement, le refroidissement rapide du corps entier n'est pas réalisable en milieu extrahospitalier. En conséquence, plusieurs groupes ont travaillé sur la mise au point de dispositifs transportables visant un refroidissement ciblé du cerveau ("casques réfrigérants" (abandonnés), évaporation de liquides volatils à proximité du cerveau).

Nous avons mis au point un procédé mettant en œuvre un concept nouveau de refroidissement de l'arrière gorge par expansion de gaz carbonique destiné à la protection du cerveau dans l'arrêt cardiaque. Nous désirons démontrer l'efficacité de la détente du gaz carbonique comme méthode hypothermisante. Nous avons antérieurement mené sur lapin une étude comparant l'hypothermie générée par cette méthode nouvelle à celle produite par l'évaporation d'un dérivé du fréon, seul autre procédé en cours de développement qui a déjà fait l'objet d'évaluations précliniques (chez le porc) et cliniques.

La présente étude nécessite quarante-deux (au total) porcs et moutons (configuration des fosses nasales différentes dans les deux espèces). Le porc est le modèle utilisé pour le développement des dispositifs existants, toutefois, le crâne du mouton, étant plus semblable à celui de l'Homme, est, de ce fait, potentiellement plus prédictif. Nos objectifs sont d'une part de quantifier l'effet hypothermisant de notre procédé sur des animaux au système circulatoire fonctionnel, dans ces deux espèces, et d'autre part de démontrer un effet neuroprotecteur dans le traitement de l'arrêt cardiaque.

502- La maladie athéromateuse voit son incidence croître dans les pays industrialisés, avec de nombreux décès chaque année. La formation de plaque d'athérome peut se développer au sein des gros troncs artériels et être à l'origine d'une dilatation anévrysmale. Selon la sévérité de l'anévrysme et afin d'éviter sa rupture, il est pratiqué de manière préventive un traitement chirurgical consistant en un clampage aortique afin de réaliser la suture de l'aorte abdominale autour d'une prothèse vasculaire. La phase la plus à risque est le déclampage aortique car elle s'accompagne d'une hypotension artérielle systémique sévère par l'hypovolémie et la séquestration splanchnique induites pendant la chirurgie. A ce jour, la vasoconstriction systémique, induite par un vasopresseur, la noradrénaline, et le remplissage vasculaire constituent les seules stratégies thérapeutiques pour limiter l'hypotension lors de la reperfusion post-chirurgicale.

C'est dans ce cadre qu'une stratégie hypothermisante pourrait permettre de réduire les lésions de reperfusion et la demande en vasopresseurs. Pour une meilleure pertinence clinique, cette hypothermie doit être instituée de manière ultra-rapide. Selon la situation clinique, son instauration pourrait être préopératoire ou, en cas d'urgence per-opératoire ou post-opératoire.

Notre hypothèse de travail est que la réduction ultra-rapide de la température corporelle à 32-34°C améliorerait la scène chirurgicale d'un point de vue hémodynamique et fonctionnel (diminution du métabolisme, de la production des facteurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques).

Dans le présent projet, nous étudierons plus spécifiquement l'hypothermie (32 °C à 34°C) induite par ventilation liquide totale par des perfluorocarbones. Ces liquides peuvent en effet être instillés avec une grande innocuité dans le poumon tout en maintenant des échanges gazeux normaux, compte tenu de leur forte concentration en oxygène et dioxyde de carbone.

503- La mesure de pression dans les loges n'est qu'un élément de diagnostic du syndrome compartimental. Elle ne doit pas être le seul critère de réalisation des dermofasciotomies.

La réalisation d'un test diagnostique peut être discriminante entre l'ischémie et la nécrose musculaire.

Hypothèse : La mesure comparative de la saturation veineuse en oxygène peut être étudiée comme marqueur de l'ischémie distale des compartiments des membres.

La mesure de la pression des loges musculaires est l'examen paraclinique de référence pour aider à la décision des incisions de décharge au stade aigu.

Cette prise de pression n'a pas d'intérêt dans les syndromes dépassés car on ne connaît pas les délais de normalisation des pressions lorsque que les lésions sont constituées

L'augmentation de pression dans les loges ne préjuge donc pas de la vitalité musculaire et donc de la capacité de récupération potentielle.

La place des gestes de décompression musculaire ne peut s'envisager que lorsque les lésions sont réversibles, c'est-à-dire à la phase ischémique. Cependant il n'existe pas de test en routine pour l'analyse musculaire en dehors de la spectrométrie tissulaire dont le coût est important.

Le syndrome compartimental est un problème de la traumatologie militaire, favorisé par des situations où les délais d'évacuation compliquent la prise en charge du combattant.

Les américains sont confrontés pendant la guerre en Irak et en Afghanistan à une augmentation des syndromes compartimentaux, liée à l'utilisation plus fréquente du garrot.

L'enjeu thérapeutique est considérable car un retard dans la décision de réaliser une fasciotomie chez le blessé de guerre est associé à un doublement du taux d'amputation de membre et à un triplement de la mortalité tandis qu'une fasciotomie incomplète est associée à un quadruplement de la mortalité.

Les lésions par explosion soit directe (Mine antipersonnel) soit indirecte par IED sous véhicule sont pourvoyeuse de syndromes compartimentaux du pied et de la jambe avec le problème de diagnostic retardé après évacuation. Ceci justifie une meilleure analyse du syndrome compartimental et de la capacité de discernement entre la phase ischémique et nécrotique pour permettre une meilleure thérapeutique.

Nous envisageons de générer un modèle expérimental de syndrome des loges chez 10 porcs par injection locale d'albumine dans le muscle et comparerons la mesure de la concentration veineuse en oxygène à celle de la pression dans la loge comme élément de pronostic de l'évolution de l'ischémie vers une nécrose.

504- Les besoins protéiques des ruminants laitiers sont élevés et nécessitent le recours à des aliments riches comme les tourteaux d'oléagineux (soja, colza) en compléments des ressources fourragères de base. Les particularités digestives des ruminants (fermentation microbienne de la ration dans le rumen) conduisent à une prévision difficile de la valeur alimentaire, notamment protéique, des aliments et souvent à un faible rendement d'utilisation de ces protéines. La connaissance fine des valeurs protéiques des aliments des ruminants et la mise au point d'aliments plus performants constituent un enjeu important de l'efficacité alimentaire, de l'environnement (réduction des rejets d'ammoniac, de nitrate et de gaz à effet de serre) et de l'autonomie protéique de l'élevage ruminant laitier. Ce projet est destiné à améliorer la connaissance et la prévision des valeurs des aliments en utilisant différents protocoles d'évaluation de ces valeurs en fonction du type d'aliment, du traitement technologique de ces aliments et de la précision souhaitée. Quatre protocoles sont utilisés dans ce projet en fonction du principe des 3R :

1) Une estimation par des fermentations in vitro.

2) Les méthodes de sachets nylons séjournant ou transitant dans l'appareil digestif des ruminants permettent de disposer d'informations complémentaires et d'établissement de valeurs alimentaires.

3) Dans quelques cas, des essais in vivo de repas tests peuvent permettre de traiter les cas qui ne seraient pas adaptés avec les solutions précédentes (intégrer l'effet de la mastication par exemple).

4) Enfin, la dégradation ruminale de compléments alimentaires solides (bolus minéraux notamment) peut être étudiée in situ.

Sur la durée du projet (5 ans) nous envisageons d'utiliser 30 vaches de race Holstein, cela représentera en moyenne 6 vaches utilisées par an. Les produits attendus de ces travaux concernent 1/ la mise au point d'aliments nouveaux dont les protéines sont mieux protégées de la dégradation par les microbes, 2/ la calibration des méthodes de laboratoire qui permettent de réduire ce nombre de mesures sur animaux 3/ la production de valeurs de référence pour les tables d'alimentation des ruminants.

505- L'âge au 1er vêlage est des critères importants dans la conduite et la gestion des élevages laitiers, à la fois du point de vue technique et économique. Les connaissances acquises sur la physiologie, la nutrition et/ou la

reproduction des animaux depuis plusieurs décennies, ainsi que les possibles évolutions liées à la sélection génétique, ne sont pas pour autant traduites par des changements de pratiques au niveau des élevages. Ceci explique un âge au 1er vêlage relativement constant (29 à 30 mois), alors que de nombreuses études économiques plaident en faveur d'un abaissement de l'âge au 1er vêlage autour de 24 mois. Des freins ont été identifiés et concernent notamment un possible retard de croissance en 1ère lactation, des performances de production plus faibles, une reproduction moins efficace. Ces résultats sont néanmoins issus de travaux anciens et ne semblent pas totalement pertinents pour les animaux « modernes ». Des travaux sont menés sur l'impact de programmes alimentaires permettant une mise à la reproduction plus précoce et visent à étudier en détails l'apparition de la puberté, le développement morphologique des jeunes et leur croissance. Les conséquences sur le comportement alimentaire, le besoin des animaux, les performances de reproduction et de production sont peu connues chez ces animaux en début de lactation et seront également étudiées. De telles données permettront de mieux affiner les modèles et recommandations pour ces animaux en début de lactation. Au final, 60 à 70 génisses laitières nées à l'automne seront utilisées dans cet essai chaque année, permettant d'étudier les interactions entre l'âge au 1er vêlage et le niveau d'alimentation en croissance. Les mesures réalisées concernent les performances de croissance (poids, note d'état, conformation, ingestion journalière), de production (quantité et qualité du lait), ainsi que les performances de reproduction (venue en chaleur, analyse de progestérone dans le lait).

506- Les effets santé associés à la consommation de fruits, légumes et céréales sont en partie associés à la richesse de ces aliments en antioxydants, dont les polyphénols. Bien que les mécanismes d'action ne soient pas encore bien définis, les polyphénols peuvent agir sur de nombreux mécanismes du métabolisme grâce à leur structure moléculaire. Ils ont ainsi été associés à des diminutions des risques de maladies cardiovasculaires, infarctus, diabète de type 2 et certains cancers. Il a aussi été montré qu'un type particulier de polyphénol, les flavonoïdes, a un effet stimulateur sur la synthèse des acides gras oméga-3 à très longue chaîne. Ces lipides sont essentiels et indispensables chez l'homme, et des modifications minimales de leurs concentrations dans un organisme sont reconnues pour avoir des effets cliniques bénéfiques importants.

Le but de ce projet est d'étudier si différents types de polyphénols, contenus dans divers aliments, présentent des potentiels équivalents d'amélioration du métabolisme des acides gras oméga-3. L'intérêt nutritionnel de nouveaux ingrédients ne peut pas être évalué uniquement *in vitro* à cause de la complexité des réactions intervenant entre l'aliment dans le tube digestif et le métabolisme interne. Le rat sera utilisé comme organisme modèle de par les données déjà disponibles chez cette espèce, et pour établir des données scientifiques avant application en alimentation humaine. Douze animaux par groupe recevront des régimes riches en polyphénols grâce à l'inclusion d'ingrédients tels que des graines oléagineuses, protéagineuses et du jus d'agrumes. Les besoins nutritionnels des animaux seront couverts et les animaux seront traités selon les règles éthiques de l'expérimentation animale. Le nombre de rats (144 animaux au total) a été évalué pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'ensemble du projet est mené par le personnel compétent en expérimentation animale.

Les résultats permettront d'identifier les aliments et les types de polyphénols ayant un effet bénéfique potentiel ainsi que d'établir les mécanismes métaboliques impliqués. A long terme il sera ainsi possible d'établir des recommandations nutritionnelles en prévention de diverses pathologies.

507- Chaque année, ce sont environ dix mille patients en France qui parviennent au stade terminal de l'insuffisance rénale, et qui débutent donc un programme contraignant de dialyse. Pour l'essentiel, ce ne sont pas des malades qui ont une maladie génétique ou même une maladie rénale spécifique : leurs reins se sont petit à petit détruits en raison d'une hypertension artérielle banale, ou d'un diabète. Pour comprendre cette susceptibilité particulière, nous voulons tester l'hypothèse que le rein peut, bien avant l'insuffisance rénale terminale, mais après un événement aigu ischémique (arrêt transitoire de l'apport d'oxygène) survenu parfois des années auparavant, « enregistrer » une agression et modifier son comportement d'une façon qui accélère son vieillissement physiologique. En biologie, le support de cette « mémoire » des événements passés est dit épigénétique : ainsi notre ADN peut, sans modifier sa séquence proprement dite, modifier son aspect et ainsi son accessibilité à des protéines qui dictent le comportement de la cellule. Par exemple, un fœtus qui a été exposé *in utero* à une privation de nourriture adopte, via des mécanismes épigénétiques, un comportement économe, lui permettant de mieux stocker les aliments ; cette adaptation peut sembler utile, mais elle est à l'origine de complications cardiovasculaires (obésité, diabète) si la nourriture vient à être abondante... Nous avons déjà démontré l'existence de modifications épigénétiques dans le rein des patients transplantés qui ont subi une

agression ischémique. Nous souhaitons maintenant établir quels gènes sont concernés, et en particulier si les cellules du rein agressées un jour, expriment durablement des gènes accélérant le vieillissement. L'intérêt de ce travail de recherche est que les marques épigénétiques sont accessibles à des médicaments. Autrement dit, si l'on peut repérer une marque préjudiciable après une agression, on peut parier qu'on pourra, en la levant, ralentir le vieillissement des reins.

Notre projet comporte une partie d'expérimentation animale, nécessaire pour la modélisation de l'impact de ces marques épigénétiques.

Il a été choisi l'espèce *Mus Musculus* C57Bl/6J, car les outils utilisés (fond génétique connu, modèle animal éprouvé, anticorps disponibles) sont au point dans cette espèce. Nous estimons qu'il faudra utiliser environ 220 souris pour répondre à l'ensemble de nos questions durant les 5 ans prévu du projet.

Dans les faits, il sera induit une insuffisance rénale aiguë par l'exérèse d'un rein et le clampage de l'artère de l'autre rein pendant 30 minutes, chez la souris. Après un temps de quelques jours à quelques semaines, les animaux seront euthanasiés et le rein restant sera prélevé et analysé pour y caractériser les marques épigénétiques, déterminer quels gènes sont concernés par ces marques, et quel est l'impact de ces marques sur le programme cellulaire.

La règle des 3R a été envisagée lors de l'élaboration du projet. Le nombre d'animaux a été réduit, notamment par la conservation des prélèvements réalisés sur les animaux pour pouvoir réaliser les analyses à distance. Les critères d'évaluation de la tolérance de la procédure ont été définis. Enfin, ce modèle d'ischémie-reperfusion in vivo est unique et il n'existe pas de modèle in vitro pouvant le substituer.

508- Les cancers du poumon sont les cancers les plus mortels. En France, ce cancer entraîne environ 27000 décès chaque année. Certaines anomalies génétiques ont été identifiées comme celles du gène RAS et sont probablement associées à une plus grande agressivité tumorale et une résistance à la chimiothérapie. Il est nécessaire de découvrir des traitements efficaces pour ce groupe de cancers du poumon.

Nous proposons d'utiliser un modèle animal murin original de cancer pulmonaire muté pour RAS (K-rasLA1) afin de mieux comprendre le rôle de ce gène dans la progression tumorale et de découvrir des traitements personnalisés de cette anomalie génétique. Lors d'un travail préliminaire sur ce modèle, nous avons montré que les lésions tumorales des animaux étaient le siège d'une réaction inflammatoire et d'une réaction angiogénique croissante lors de la progression maligne. Notre objectif est de réaliser une banque de tissus tumoraux et sains pulmonaires et de liquides biologiques de ce modèle K-rasLA1 et des souris sauvages de même fonds génétique afin d'étudier les mécanismes de la progression tumorale, et plus particulièrement la réaction inflammatoire et angiogénique. Cette stratégie nous semble pertinente à la mise en évidence in vitro de nouveaux marqueurs et nouvelles molécules thérapeutiques, et permettrait à mettre en place de futures études précliniques.

L'utilisation de culture de cellules tumorales in vitro ne permet pas l'étude de la progression tumorale dans son environnement global (angiogénique, inflammatoire et immun). Ce modèle de souris est le seul existant dans le monde mimant parfaitement le développement progressif de ce groupe de cancer pulmonaire. Pour obtenir des résultats statistiquement analysables, il faut beaucoup d'individus et beaucoup de tumeurs : le choix d'un modèle murin est donc primordial de par leur reproduction très rapide et leurs conditions d'élevage.

Pour l'ensemble de ce projet (entretien de la lignée animale, banque de liquides et de tissus issus des animaux ayant le cancer et des animaux sains, de même fonds génétique, à des âges différents) nous utiliserons 153 souris. Tous les animaux générés pour ce projet seront utilisés dans l'étude.

509- Ce projet a comme but principal de mettre en évidence les mécanismes comportementaux et neurobiologiques responsables des effets positifs de l'exposition à un environnement stimulant sur l'addiction et plus particulièrement les risques persistants de rechute. Notre hypothèse de travail est que les drogues allèrent de façon durable le fonctionnement du cerveau et par conséquent, le comportement et qu'une exposition à un environnement stimulant contrecarre ces altérations et normalise le comportement. Nous allons utiliser des modèles animaux d'addiction et nous allons les combiner avec 1) des mesures comportementales des performances cognitives; 2) des mesures comportementales de réponses émotionnelles; et 3) des mesures neurobiologiques de changements cérébraux induits par la drogue.

En résumé, toutes les expériences auront 3 phases en commun et une 4ème phase qui changera en fonction de la mesure réalisée (cognition, stress et neurobiologie).

La phase 1 correspond à la chirurgie pour l'implantation d'un cathéter chronique dans veine jugulaire de rats. La phase 2 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) d'une drogue dans des cages opérantes.

La phase 3 correspond à une période d'abstinence pendant laquelle les rats sont hébergés dans un milieu enrichi ou standard.

Pour les tests de cognition, la 4ème phase consiste à mesurer plusieurs performances cognitives telles que la prise de décision, la flexibilité comportementale, l'impulsivité dans des tests opérants validés.

Pour les tests de réponses émotionnelles, la 4ème phase consistera à mesurer la réactivité au stress et la dépression dans de tests modèles validés tels que la nage forcée, le labyrinthe en croix et l'open field.

Pour la neurobiologie, nous allons prélever le cerveau des animaux et mesurer les taux de protéines ou des ARN des gènes sensés être altérés par la drogue et/ou le milieu enrichi.

Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut être mené uniquement sur un animal vivant. Néanmoins nous avons pris en considération la règle de 3Rs pour minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nous avons calculé que pour cette étude 896 rats seront nécessaires pour obtenir de 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.

510- Les microARN sont des ARN non codants de 19 à 24 nucléotides qui contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. Plusieurs centaines de gènes codant pour des microARN ont été identifiés chez les mammifères. Ces microARN régulent l'expression génique en s'appariant avec des ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation a pour effet le clivage de l'ARNm ou l'inhibition de la traduction. La conséquence de cette hybridation est la diminution du niveau de protéine, mais la quantité d'ARNm peut rester constante, diminuer ou augmenter. Le rôle des microARN a été démontré dans la régulation de nombreux processus comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, le développement, la différenciation, l'inflammation, la réponse au stress et la tumorigénèse.

L'oncoMir-155 est un miARN surexprimé dans les cancers du sang mais également dans les tumeurs solides telles que celles du poumon, du colon et du sein ainsi que les tumeurs pancréatiques. Les souris transgéniques exprimant ce micro ARN développent une leucémie. Le miR-155 est donc un oncogène potentiel fait que lui a valu sa dénomination d'oncomiR-155. Une série d'expériences réalisées par notre équipe a permis de démontrer que l'expression de TP53INP1 (un gène suppresseur de tumeur précocement éteint dans le cancer pancréatique) est sous le contrôle du miR-155. Également le blocage du miR-155 par un oligonucléotide anti-miR-155 provoque la réexpression de TP53INP1 ainsi que la restauration de son activité pro-apoptotique dans des cellules cancéreuses pancréatiques. La surexpression du miR-155 semble donc à l'origine de l'extinction de l'expression de TP53INP1. Des inhibiteurs de l'activité miR-155 existent actuellement (antagomir-155). Nous avons récemment montré que l'antagomir-155 permet la restauration de l'expression et de l'activité pro-apoptotique de TP53INP1 dans des cellules pancréatiques en culture. Ces résultats nous semblent encourageants et nous souhaitons donc considérer la possibilité d'utiliser cet antagomir pour le traitement de l'adénocarcinome pancréatique.

Afin de valider la relation entre miR-155, TP53INP1 et progression du cancer pancréatique dans un modèle animal, nous avons construit une souris transgénique permettant la surexpression conditionnelle et concomitante de miR-155 et de la luciférase dans le pancréas. Les animaux transgéniques sont actuellement dans notre animalerie. Ils seront croisés avec les souris KrasG12D-Pdx1-cre afin d'induire un processus tumoral spécifiquement dans les cellules pancréatiques. Les animaux ainsi obtenus permettront d'évaluer le rôle de la surexpression du miR-155 dans l'évolution de dysplasies pancréatiques. Grâce à l'expression simultanée de la luciférase, nous pourrions suivre l'évolution des tumeurs jusqu'aux stades métastatiques en mesurant la luminescence in vivo par Photon Imager (appareil présent dans la zone expérimentale de l'animalerie) et par histopathologie. Puisque TP53INP1 semble être la cible de miR-155, les souris transgéniques surexprimant miR-155 devraient se comporter comme des souris déficientes en Tp53inp1 (actuellement à l'étude dans notre laboratoire) développant des lésions cancéreuses pancréatiques plus précoces et plus évoluées. Dans ce cas, le lien de causalité entre la surexpression de l'oncomiR-155, la disparition de la protéine suppresseur de tumeur TP53INP1 et l'adénocarcinome pancréatique serait établi permettant d'envisager une utilisation thérapeutique d'un antagoniste de miR-155.

Nous estimons à 80 le nombre d'animaux impliqués dans ce projet.

511- Ce projet a pour objectif de mesurer l'effet d'une stratégie de supplémentation alimentaire en minérale et en vitaminique destinée à limiter les effets de stress thermique sur des vaches laitières. Quatre vaches laitières seront soumises à deux périodes de stress thermique (26,3°C de température moyenne journalière) de 3 semaines chacune. La première période de stress thermique sera précédée de 2 semaines d'adaptation à la

chambre climatique à une température neutre et les deux périodes de stress thermique seront coupées également d'une période sans stress thermique de 2 semaines. Pendant les périodes sans stress thermique, la température de la salle sera de 18°C. La chambre climatique permettra de maintenir les 4 vaches ensemble, en stabulation entravée comme cela est pratiqué notamment l'hiver dans les élevages de montagne. Les vaches seront traitées deux fois par jour comme cela est pratiqué en élevage laitier. Elles auront un libre accès à l'alimentation et à l'eau d'abreuvement.

Les mesures sur ces animaux consisteront à peser tous les jours les quantités consommées et refusées d'aliment, ainsi que la production laitière. Ces animaux auront avalé avant l'essai un bolus ruminal destiné à suivre en continu par télémétrie leur température ruminale. Leur fréquence respiratoire sera mesurée par observation tous les jours. Durant 4 jours répartis sur l'essai, des prises de sang seront réalisées à raison de 5 prélèvements de 2 ml en 24 heures, pour évaluer les régulations acido-basiques des vaches. Les vaches seront équipées d'un licol sur lequel une poire en position sous mandibulaire permettra l'évaluation de leur temps d'ingestion et de rumination. Ce système a été conçu pour ne pas créer de contrainte sur l'animal en stabulation entravé.

Le schéma statistique sera un schéma en inversion où chaque individu sera soumis à une période de stress thermique avec et sans supplémentation minérale et vitaminique adaptée. Les effets attendus du stress thermique simulé dans cet essai font que 4 individus est un effectif suffisant pour observer des différences statistiquement significatives.

512- L'équipe tente d'étudier, de comprendre, d'améliorer et de mettre en œuvre par des études précliniques dans des modèles animaux de nouvelles stratégies vaccinales contre les infections virales ou les cancers, et s'efforce de transférer ses connaissances vers des études cliniques chez l'homme. Notre projet comporte deux volets reliés entre eux: la compréhension des réponses immunitaires aux vaccins et le développement de nouvelles stratégies de vaccination. En effet, le développement de nouvelles stratégies vaccinales dépend de l'état de nos connaissances des mécanismes de la réponse immunitaire contre les infections virales et les vaccins. Bien que la réponse humorale garde une place primordiale dans la vaccination, la thématique de recherche est principalement centrée sur l'étude du rôle de la réponse cellulaire T, cruciale dans la lutte contre certaines infections virales ou dans les stratégies vaccinales anticancéreuses. Notre centre d'intérêt se porte également sur l'étude des étapes initiales de la réponse immunitaire, qui conditionnent l'efficacité de celle-ci. L'exemple le plus marquant de nos activités de transfert vers des études cliniques est le développement de la méthode de vaccination transcutanée dans des modèles murins et sur des explants de peau humaine jusqu'à la mise en place d'étude pilote et d'étude de phase I chez l'homme.

Cependant des contraintes éthiques et financières rendent l'étude de l'ensemble de ces mécanismes chez l'homme difficile. Les différents modèles murins utilisés nous offrent la possibilité de décortiquer l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors d'une réponse immunitaire. Les souris conventionnelles (C57BL/6 et BALB/c) et transgéniques (Langerin-DTR-GFP; Knock-out (KO) pour récepteurs chimiokines) nous permettent d'avoir une connaissance approfondie des mécanismes de la réponse immunitaire. Le modèle de souris immunodéficientes (NOD-SCID $\beta$ c-/- (NSG); NSG/HLA-A2/DR) humanisées avec des cellules souches ou des explants de peau humaine nous permet d'établir un lien fort entre nos études précliniques sur les souris conventionnelles et les études cliniques chez l'homme. L'ensemble du projet prend en compte la règle des 3R. Si cela est possible, nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles et les utilisateurs afin de réduire le nombre d'animaux et le nombre de groupes contrôle. Nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance des animaux ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Sur l'ensemble du projet, et en prenant en compte la règle des 3R, nous utiliserons environ 5290 souris, toutes lignées confondues.

Ce travail sera donc un appui important à la recherche de protocoles thérapeutiques et préventifs contre des agents infectieux responsables de problèmes mondiaux de santé publique.

513- Chez la poule, la composition en acides gras des œufs est fortement influencée par la composition en acides gras des aliments distribués pendant la période de ponte.

L'enrichissement en acides gras (AG) n-3 des produits animaux destinés à la consommation humaine permet d'améliorer leur qualité nutritionnelle et donc la santé des consommateurs. La présente étude a pour objectif de tester de nouvelles matières premières (graines de lin dépelliculées, microalgues) en comparaison avec des matières premières déjà connues (graines de lin extrudées) dans l'alimentation des poules pondeuses qui permettront d'enrichir leurs œufs en AG n-3 sans affecter les performances de ponte des animaux. Il s'agit d'alimenter avec différents régimes et dans des conditions d'élevage standard 200 poules afin de suivre leurs

performances de ponte (poids vif, consommation alimentaire, nombre et qualité visuelles des œufs pondus) et d'analyser la teneur en lipides, la composition en acides gras et la qualité sensorielle des œufs.

514- Le test pyrogène sur lapins est décrit dans les Pharmacopées européenne, américaine ou asiatique, qui sont les référentiels pharmaceutiques pour la réalisation des tests de contrôle qualité.

L'objectif de ce test est de détecter la présence de molécules pyrogènes, c'est-à-dire pouvant provoquer une augmentation de la température, à l'intérieur de produits pharmaceutiques ou médicaments expérimentaux. Pour cette détection, le produit à tester est injecté à un groupe de 3 lapins, et la température de ces animaux est mesurée afin de déterminer la hausse de température éventuelle.

Cet essai ne peut pas aujourd'hui être réalisé ex vivo pour plusieurs raisons :

- Le test des endotoxines bactériennes, qui peut être utilisé comme variante au test pyrogène, ne détecte que les molécules type endotoxines, alors que le test sur lapins permet de détecter tout type de molécules pyrogènes.
- Il n'existe pas aujourd'hui d'équivalent in vitro au test pyrogène, qui soit validé et décrit dans les référentiels pharmaceutiques.
- Il s'agit d'un test réglementaire, obligatoire à partir du moment où il est enregistré dans le dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché) du produit.

La Pharmacopée s'exprime par rapport à l'expérimentation animale : « Conformément à la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (1986), la Commission s'est engagée dans la voie de la réduction de l'emploi d'animaux dans les essais de pharmacopée, chaque fois que possible, et elle encourage tous ceux qui contribuent à ses travaux à chercher des méthodes alternatives ne nécessitant pas l'emploi d'animaux. Un essai sur animaux n'est introduit dans une monographie que lorsqu'il a été démontré qu'il est nécessaire pour un contrôle satisfaisant aux fins de la Pharmacopée. »

Le test pyrogène comporte plusieurs étapes :

- Prétest : Administration aux lapins de chlorure de sodium isotonique, et mesure de la température. Les lapins montrant une élévation de température ne sont pas sélectionnés pour le test.
  - Test : Après validation du prétest, administration à un groupe de 3 lapins du produit client à la dose déterminée par le client (dose équivalente à la dose humaine), et mesure de la température des lapins.
- Interprétation des hausses de températures selon les Pharmacopées ou protocoles clients (dossiers d'AMM). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les tests pyrogènes, une réutilisation des lapins est possible pour plusieurs tests pyrogènes successifs (car la procédure est de classification modérée).

Le nombre d'animaux prévu pour ces protocoles est d'environ 7000 par an.

515- Dans les sociétés industrialisées, l'obésité et le syndrome métabolique qui y est associé se développent à la vitesse d'une épidémie et concerne, en France, environ 40% des individus. Ces deux anomalies métaboliques, liées à l'ingestion excessive d'acides gras saturés, conduisent à l'installation ultérieure du diabète de type 2 qui accroît le risque cardiovasculaire, notamment en favorisant le développement d'une cardiomyopathie diabétique. Cette dernière est associée à un stress oxydant intracellulaire important qui pourrait être contrecarré par l'ingestion d'un substrat à caractère réducteur comme le lactate connu pour augmenter le potentiel redox cytosolique. De plus, le diabète de type 2 réduit la teneur circulante de magnésium et la restauration de la concentration de ce cation présente des propriétés antidiabétiques.

L'objectif du travail consiste donc à déterminer l'influence de l'ingestion d'une teneur modérée de lactate de magnésium sur le syndrome métabolique et la fonction cardiaque. Les expérimentations seront réalisées sur 54 rats Wistar nourris avec un régime standard (A04, Safe) ou avec un régime riche en graisses saturées (huile de palme). Les animaux de chaque groupe seront subdivisés en trois sous-groupes supplémentés ou non en lactate de magnésium (10 mM) ou en chlorure de magnésium (pour discerner l'effet protecteur éventuel du lactate). Le lactate de magnésium et le chlorure de magnésium seront apportés par l'eau de boisson et les animaux auront toujours le choix entre une eau contenant ces composés ou une eau qui en est dépourvue. Les trois sous-groupes de rats nourris avec un régime témoin présentent l'intérêt d'évaluer les effets secondaires possibles du lactate de magnésium (hyperglycémie, acidose avec changement comportemental, diarrhées, etc.).

516- Des études épidémiologiques et expérimentales ont conduit à proposer l'hypothèse de l'origine foetale des maladies de l'adulte. Ainsi, il est aujourd'hui bien admis qu'un environnement foetal défavorable entraîne une perturbation des fonctions cardiovasculaires.

L'épidémie actuelle d'obésité conduit à une augmentation du diabète maternel au cours de la grossesse. Afin d'étudier les conséquences d'une exposition in utero à un diabète maternel, des rates sont rendues diabétiques par injection de streptozotocine le premier jour de la gestation. Il s'agit d'une substance qui détruit les cellules  $\beta$  du pancréas (productrices d'insuline) et qui entraîne donc un diabète de type 1 chez ces femelles. Dans ce modèle, nous avons clairement identifié l'exposition in utero au diabète maternel comme facteur de risque du développement d'une hypertension artérielle à l'âge adulte. D'autre part, nous avons montré qu'il existait un profil d'expression spécifique au niveau aortique favorisant une vasoconstriction et pouvant être relié au développement de l'hypertension artérielle chez ces animaux. Pourtant nous n'observons aucun remodelage constrictif hypertrophique des vaisseaux en réponse à cette augmentation de pression (mécanisme nécessaire pour normaliser les contraintes subies par la paroi artérielle lorsque la pression augmente mais devant néfaste à plus long terme : fatigue du cœur). Ceci pourrait refléter une adaptation du vaisseau suite à une reprogrammation de la fonction vasculaire affectant également les mécanismes de remodelage au cours de la vie fœtale.

Nous souhaitons étudier les mécanismes du remodelage artériel suite à l'exposition in utero au diabète maternel afin de mieux appréhender la reprogrammation vasculaire en réponse à des modifications d'environnement fœtal. Grâce à un modèle de variations chroniques de débit induites par microchirurgie vasculaire (de 7 jours à 1 mois), il est possible d'induire un remodelage soit excentrique (lorsque le flux augmente), soit constrictif (lorsque le flux diminue). Ainsi nous comparerons les effets des variations chroniques de débit chez les rats mâles et femelles âgés de 3 mois (stade pré-hypertensif) issus de mères contrôles (CMO) et diabétiques (DMO).

Les objectifs de ce projet sont de chercher :

- 1) à étudier les effets de l'exposition in utero au diabète maternel sur le remodelage vasculaire induit par des variations chroniques de débit sanguin dans les artères mésentériques,
- 2) à étudier les modifications des voies de signalisation impliquées dans le remodelage vasculaire au cours de l'exposition in utero au diabète maternel (voie du monoxyde d'azote, induction des transglutaminases)
- 3) à rechercher des différences mâles/femelles (rôle des estrogènes)

Notre modèle animal est le rat Sprague-Dawley. Pour l'expérimentation, nous utiliserons 213 animaux au total avec 4 groupes expérimentaux pour chaque durée de ligature (CMO et DMO mâles et femelles après 7 jours, 2 semaines ou 1 mois de ligature des artères mésentériques) composés chacun de 12 animaux provenant d'au moins 4 mères différentes + 15% de mortalité + 33% pour combler le déficit de femelles / aux mâles observé lors de précédentes études (soit  $144+15\%+33\%=213$ ).

Pour l'accouplement, nous utiliserons 25 animaux au total avec 5 mâles et 20 femelles (en moyenne 2 portées par femelle, une portée CMO et une portée DMO).

517- Les conséquences pathologiques à long terme – se révélant à l'âge adulte - d'évènements survenant durant la vie fœtale et la période périnatale définissent le concept de programmation périnatale.

Il est bien connu que l'obésité maternelle avant et pendant la grossesse perturbe l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, la synthèse des acides aminés et le métabolisme des graisses, augmentant ainsi le risque d'obésité et de comorbidités pour le nouveau-né et, à plus long terme, prédispose ces enfants à l'hypertension artérielle. Chez la mère, l'obésité entraîne de graves conséquences sur la fonction vasculaire comme une dysfonction endothéliale et un accroissement du stress oxydant aussi bien dans la pathologie humaine que dans de nombreux modèles expérimentaux. Une transmission directe de ces anomalies vasculaires par des mécanismes d'épigénétique, indépendamment des anomalies métaboliques, pourrait expliquer, en partie le développement à l'âge adulte de l'hypertension artérielle chez les enfants nés de mères obèses.

Nos objectifs sont :

- 1) d'évaluer si il existe une transmission directe des anomalies vasculaires de la mère obèse à ses nouveau-nés par des mécanismes de reprogrammation fœtale,
- 2) d'étudier le développement des anomalies vasculaires chez les animaux issus de mères obèses (étude à différents âges : naissance, sevrage, 3 mois, 6 mois, 12 mois, 18 mois),
- 3) d'étudier si il existe une corrélation entre les anomalies métaboliques chez le nouveau-né et les possibles anomalies vasculaires à l'âge adulte,
- 5) d'étudier les effets de l'alimentation post-natale sur le développement de ces anomalies vasculaires (adoption des petits issus de mères obèses par des mères contrôles).

Le modèle utilisé est un modèle de rat Sprague-Dawley dont les femelles seront rendues obèses par un régime riche en sucre et graisse. Ce modèle d'obésité est le plus proche de la réalité nutritionnelle chez l'homme. Pour l'expérimentation, nous utiliserons au total 480 animaux composés 4 groupes expérimentaux (animaux mâles



et femelles issus de mères contrôles, CMO et de mères obèses, OMO) pour chaque âge d'étude, composés chacun de 10 animaux provenant d'au moins 3 mères différentes. Pour l'accouplement, nous utiliserons 55 animaux au total avec 10 mâles non obèses et 45 femelles (30 femelles rendues obèses et 15 femelles contrôles servant également pour les adoptions).

518-1-Objectif scientifique du projet: Les Henipavirus sont des virus zoonotiques (passant de l'animal à l'homme), qui ont émergé en Australie puis en Asie du Sud-Est pendant les années 90. Ce nouveau genre est composé de deux virus appelés respectivement Hendra (HeV) et Nipah (NiV). Le virus Hendra est apparu le premier et cause des ravages dans les troupeaux de chevaux australiens. En 1998, en Malaisie, NiV a émergé, via les chauves-souris, chez les porcs avant de se transmettre à l'homme provoquant l'infection de 265 personnes, avec 40% de mortalité. Pour enrayer cette épidémie plus d'un million de porcs furent euthanasiés. Cette infection représente la zoonose virale la plus dangereuse transmise par les chauves-souris, posant des problèmes médicaux et économiques sérieux. Depuis, 15 réémergences se sont succédées en Inde et au Bangladesh avec plus de 80% de mortalité humaine et une transmission interhumaine reconnue et presque systématique. Plus récemment, la découverte de l'exposition d'une forte proportion des porcs du Ghana au NiV, a attiré une attention particulière de l'OIE et l'OMS concernant le danger grandissant encouru si rien n'est entrepris pour lutter contre les zoonoses à Henipavirus. De plus, l'absence de traitement et de vaccin efficaces ainsi que la forte mortalité qu'ils engendrent, font de ces virus un réel danger pour l'homme et de potentiels agents de bioterrorisme. Ce projet vise à étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la haute pathogénicité des Henipavirus dans le but de comprendre les différentes étapes de la pathogenèse virale, de son entrée à son excrétion, afin de mieux cibler de nouvelles thérapies préventives ou curatives identifiées par notre laboratoire.

2- Retombées attendues: Le projet vise à mieux comprendre la pathogenèse des Henipavirus, afin de mieux combattre ces infections émergentes. La meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des interactions entre virus et cellules cibles permettra de cibler au plus précis de potentiels médicaments ou vaccins, inexistants chez l'Homme à l'heure actuelle.

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

Toutes les étapes du projet sont basées sur des études effectuées et validées auparavant par une méthode *in vitro*. Cependant, l'interaction entre le virus et l'intégralité du système immunitaire d'un individu est un événement beaucoup trop complexe pour être réduit à l'utilisation de lignées cellulaires et requiert l'utilisation du modèle animal. Malgré la grande diversité de modèles animaux existants pour étudier ces infections (chat, cheval, furet, singe, cochon d'Inde, ...), nous avons fait le choix de n'utiliser que des modèles rongeurs (hamster et souris) qui se révèlent très performant et mimant parfaitement les cas d'infection chez l'Homme.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet: Sur une période de 5 ans, nous prévoyons l'utilisation de 1236 animaux. Les expériences sont organisées sur des groupes de 6 animaux pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats et correspond à l'utilisation d'environ 40 groupes par an.

519- Le projet porte sur l'étude de la physiopathologie des troubles de l'humeur et de l'addiction. Il est centré sur la régulation des systèmes sérotoninergique, neurotrophique et corticotrope en relation avec des troubles anxio-dépressifs induits par un stress ou observés suite à une mutation génétique. Ce projet nécessite différentes approches précliniques. Son objectif scientifique est d'acquérir une meilleure compréhension des processus physiopathologiques complexes responsables des désordres psychiatriques chez l'homme. Ces processus impliquent l'interaction de plusieurs facteurs allant de la génétique à l'environnement. De telles interactions ne peuvent être modélisées de façon réaliste que dans un organisme intact, et de préférence chez un mammifère. Ainsi, les rongeurs sont les espèces de mammifères les plus adaptées et facilement accessibles pour ces investigations. Le projet nécessitera l'utilisation de souris (Souris, *Mus musculus*, n = 600/an, soit 3000 sur 5 ans). Le nombre total d'animaux utilisés dans chaque lot expérimental sera limité au minimum nécessaire pour l'obtention de résultats scientifiquement valables. Des tests séquentiels permettront d'utiliser les mêmes lots d'animaux dans des séries expérimentales espacées de 1 à 2 semaines. Dans la mesure du possible, les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les tests comportementaux et pour les études anatomiques / biochimiques/électrophysiologiques.

520- Des mutations du gène LMNA, codant les lamines A et C, sont responsables de dystrophies musculaires associées à des atteintes cardiaques. Deux mutations identifiées chez les patients ont été reproduites chez la souris (*mus musculus* sur fond mixte C57bl/6 / 129Sv) par Knock In. La première (LmnaDelK32) localisée sur l'exon 1 provoque à l'état homozygote la mort des souris avant l'âge de 3 semaines suite à un retard de la maturation

des muscles striés et des défauts métaboliques sévères et à l'état hétérozygote une cardiopathie dilatée causant la mort des souris à l'âge de un an. La deuxième (LmnaH222P) localisée dans l'exon 4 provoque une dystrophie musculaire associée à une cardiopathie dilatée causant la mort des souris vers l'âge de 8 mois.

L'utilisation d'un modèle murin est indispensable à l'élaboration et l'évaluation de l'efficacité d'approches thérapeutiques innovantes.

L'objectif de notre projet est d'utiliser trois techniques de thérapie génique dans nos deux modèles KI comme nouvelles alternatives thérapeutiques :

Surexpression de la lamine A (stratégie 1a) ou lamine C humaine (stratégie 1b)

Réparer l'ARNm du gène LMNA par trans-épissage (stratégie 2)

Corriger les mutations du gène en utilisant les TALE nucléases (stratégie 3)

Nous allons déterminer la capacité de la meilleure technique à restaurer le phénotype musculaire et/ou cardiaque in vivo en utilisant des Adéno-Associated Virus (AAV) qui seront injectés en systémique ou en intra-musculaire dans les modèles KI du laboratoire. Un nombre total de 140 souris sera utilisé afin de réaliser les objectifs de ce projet. Pour chaque stratégie, 3 ou 4 groupes de souris (10 souris par groupe) seront utilisés (WT vs KI, différents modes d'administration des vecteurs). Ainsi, nous utiliserons 60 souris pour la stratégie 1, 40 souris pour la stratégie 2 et 40 souris pour la stratégie 3.

Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données.

Afin de minimiser les interventions sur les animaux au cours du protocole, les explorations fonctionnelles seront réalisées sous anesthésie légère et ceci deux fois, une fois avant l'injection des AAVs et une fois avant le sacrifice des souris.

La durée du protocole dépend du modèle animal (DelK32 vs H222P, homozygote vs hétérozygote), de l'âge des souris au début du protocole (nouveaux nés vs souris adultes) et de la réversion du phénotype fonctionnel et de la survie.

Les deux modèles murins utilisés ont des durées de vie plus ou moins courtes, la survie constitue donc un point limite très important dans l'évaluation des différentes thérapies utilisées. L'utilisation des AAV se fera initialement sur les souris contrôles afin de vérifier une éventuelle toxicité et d'y remédier en utilisant des titres plus bas pour les souris KI.

521- Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 400/0 d'entre eux sont liés à une hémorragie. Le choc hémorragique est ainsi la deuxième cause de mortalité après les traumatismes crâniens. L'état de choc se caractérise par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic vital du patient. En conséquence) améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé. Parmi les pistes potentielles, HEMARINA-M101 (M101), biopolymère développé par la société HEMARINA à partir de l'hémoglobine extracellulaire d'*Arenicola marina* apparaît être un excellent candidat. En effet, M101 a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O<sub>2</sub> à saturation) et son innocuité sur plusieurs modèles animaux.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de ce composé dans la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé. Les travaux réalisés se veulent au plus proche « du terrain ». Ainsi, les protocoles expérimentaux réalisés sur modèle murin seront calqués sur les modalités de prise en charge clinique du choc hémorragique non contrôlé. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité d'HEMOXYCarrier® dans le cadre de la prise en charge du choc hémorragique non contrôlé avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 36 mois. Il est divisé en 2 phases. La première phase a pour objectif de déterminer l'efficacité et l'innocuité de M101 lors de la prise en charge du choc hémorragique. Elle impliquera l'utilisation de 60 rats Sprague-Dawley.

La seconde phase permettra d'évaluer le bénéfice du traitement par HEMOXYCarrier® sur les principales conséquences du choc hémorragique (métabolisme) inflammation, coagulation et microcirculation). Elle s'attachera en outre à valoriser les résultats obtenus en termes de communications et publications scientifiques. Cette deuxième phase impliquera elle aussi l'utilisation de 60 rats Sprague-Dawley.

Les résultats attendus sont une amélioration significative de la survie des rats bénéficiant d'une prise en charge par M 101 par rapport aux rats avec une réanimation conventionnelle ainsi que vis-à-vis du groupe contrôle. A tenue l'objectif est le développement d'une solution de réanimation utilisable en intraveineux direct assurant à la fois une oxygénation tissulaire et un maintien de la volémie.

En clinique humaine, cette solution remplacerait l'association soluté d'expansion volémique et concentré sanguin globulaire (issu des collectes de sang) utilisé actuellement. Cette nouvelle solution s'affranchirait des contraintes liées à l'histocompatibilité des groupes sanguins A/B/O rhésus. La solution permettrait un usage hospitalier et extrahospitalier afin d'assurer une ré-oxygénation tissulaire précoce des tissus en souffrance anoxique tel que les chocs hémorragiques, les pneumonies graves, les infarctus du myocarde ou encore les accidents vasculaires cérébraux. De même, elle pourrait potentiellement être un produit de substitution transitoire aux globules rouges sanguins lors des chirurgies hémorragiques.

522- 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. Même si il existe plusieurs hypothèses tentant d'expliquer le développement tumoral en réponse à la migration transépithéliales des neutrophiles, il n'en reste pas moins que ce processus pathophysiologie est complexe et que sa compréhension reste une énigme.

Dans une tumeur, les cellules cancéreuses sont englobées dans un micro environnement inflammatoire composés de plusieurs types de cellules parmi lesquelles les leucocytes polymorphonucléaires, communément appelés neutrophiles. 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. Cependant, les relations qui existent entre cytokines, cellules épithéliales et neutrophiles, ainsi que leurs conséquences sur la régulation des voies de signalisation en aval sont très peu connues à ce jour.

La découverte des petits ARN non codants, les microARN 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 le rôle du miR-223 dans la survenue des cancers ainsi que la dissémination des cellules tumorales. Pour cela nous avons trois objectifs principaux, (1) déterminer l'impact du miR-223 sur le développement de carcinomes des voies digestives supérieures, (2) déterminer l'impact du miR-223 sur la migration de cellules cancéreuses pulmonaires (modèle métastatique) et (3) évaluer l'impact du miR-223 sur la résistance aux drogues cytotoxiques et à des thérapies ciblées dans ces deux types de tumeurs. Nous utiliserons pour ce projet un total de 489 souris, réparti entre des souris Nude (240 animaux) et des souris C57Bl6 (249 animaux). 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 et composés pharmacologiques) sur la croissance tumorale. Une partie des expériences sera faite sur des souris NUDE. Cette souche est un bon modèle pour les études pharmacologiques en cancérologie car les souris sont immunodéficientes et par conséquent acceptent des xénogreffes de cellules cancéreuses humaines. De plus l'absence de poils est un avantage certain pour suivre la croissance des tumeurs sous la peau. 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. La deuxième partie des expériences sera faite sur des souris C57Bl6. Cette souche 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.

523- La Licence Sciences, Technologie et Santé, et la Licence Technologie pour la Santé donnent aux étudiants les moyens d'acquérir les technologies de base, les méthodes de travail et les savoir-faire nécessaires à leur insertion sur le marché du travail ou à une poursuite de leurs études dans les domaines de la biologie et des biotechnologies de la santé. Or, les rongeurs sont largement utilisés en recherche (fondamentale et appliquée) et en développement dans ces domaines professionnels.

La mise en place de travaux pratiques utilisant des animaux vivants vise à familiariser les étudiants à l'expérimentation en physiologie animale, à leur enseigner les connaissances pratiques de techniques d'étude sur animal vivant et à les sensibiliser aux notions éthiques et réglementaires de l'expérimentation animale. Elle répond par ailleurs au référentiel de compétences en Licence précisant que les étudiants doivent être formés à "utiliser un dispositif expérimental sur un organe isolé, un animal adulte ou en cours de développement, en particulier connaître et utiliser des concepts et techniques de la physiologie animale". Cet enseignement pratique,

mise en place en 3<sup>e</sup> année de licence, se déroule sur 2 semestres : un TP d'introduction à l'expérimentation animale au premier semestre, et, au semestre suivant, trois TP illustrant chacun une fonction physiologique majeure. La présente demande concerne ces quatre TP. La formation sera réalisée sur des rats adultes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un rat sera attribué par binôme d'étudiants. Ainsi, à raison d'un rat par binôme d'étudiants et par TP, avec en moyenne 200 étudiants inscrits en Licence par an et un total de 4 séances de TP, 400 rats seront utilisés chaque année, soit 2000 animaux pour la durée totale (5 ans) de ce projet. Les expérimentations seront réalisées sur animaux anesthésiés (injection intrapéritonéale d'un anesthésique et d'un analgésique), et seront sacrifiés en fin de TP sans réveil. Les enseignants qui encadrent les TP sont titulaires de la formation d'expérimentation sur animaux vivants (niveau 1) et pour certains de la formation à la chirurgie expérimentale des rongeurs.

Plusieurs raisons expliquent le recours au modèle animal :

- 1- cette formation procure aux étudiants un premier contact avec une expérimentation sur un animal vivant ;
- 2- elle permet l'acquisition des gestes techniques (pose de cathéters, recueil de liquides biologiques) qui donnent la possibilité d'évaluer, les réponses physiologiques à différentes stimulations au niveau intégré sur l'organisme entier.

524- Le but de ce projet est d'évaluation de l'effet thérapeutique du myo-inositol trispyrophosphate (ITPP) sur la progression de la cardiomyopathie dans le cadre de la dystrophie musculaire liée à des mutations dans deux gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *mus musculus*. En effet, Afin d'étudier la physiopathologie de cette pathologie nous avons créé un modèle murin par transgénèse ciblée porteur d'une mutation décrite chez l'homme. Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de cette pathologie ; atteintes des muscles squelettique et cardiaque. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux provoqué principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent ce modèle constitue le modèle de référence pour tester l'administration d'ITPP à fin de déterminer ces effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie.

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 32. Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données.

Afin de minimiser les interventions sur les animaux au cours du traitement, l'administration de l'ITPP sera effectuée à l'aide de mini pompe osmotique en sous cutané. L'installation de ces minis pompes nécessite une anesthésie légère. Elles sont très bien tolérées.

La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. L'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction sur le muscle squelettique est réalisée *ex vivo*.

Le milieu est enrichi avec du woodwools ou du coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris.

525- Le but de ce projet est l'entretien d'une lignée de souris génétiquement modifiée.

Ce projet utilise des souris *mus musculus*. Le choix de cette espèce est motivé par les limites des techniques de transgénèses ciblées. Seule cette espèce peut être génétiquement modifiée.

Le nombre d'animaux nécessaire pour entretenir la lignée est évalué à 90.

Dans le cadre de nos travaux sur la dystrophie musculaire causée par des mutations dans un gène codant une protéine nucléaire, notre équipe a développé un modèle murin (souris) génétiquement modifié portant une mutation ponctuelle décrite chez des patients atteints de cette pathologie. Ce modèle murin récapitule la pathologie humaine et plus particulièrement le phénotype du muscle strié. L'utilisation de ce modèle nous permet de disséquer les mécanismes moléculaires et les voies de signalisations impliquées dans l'apparition du phénotype mais aussi d'étudier la physiologie du muscle squelettique et cardiaque. L'ensemble de ces travaux ayant pour but de mieux comprendre cette pathologie et de concevoir des approches thérapeutiques innovantes ; thérapies géniques et/ou cellulaires mais aussi pharmacologiques. Les procédures expérimentales utilisées à ces fins seront décrites dans des demandes d'autorisations spécifiques, celles-ci concernant uniquement l'entretien de la lignée en animalerie.

Afin de réduire le nombre de souris générées, le nombre de croisements est contrôlé et seul des croisements donnant des génotypes d'intérêt sont réalisés.

Les animaux sont stabulés suivant un programme d'enrichissement permettant la nidification, le jeu et le repos, mis en place au sein du centre d'élevage. Les souris sont sacrifiées à un âge limite en amont du développement d'un phénotype dommageable.

526- Notre équipe de recherche est orientée vers l'étude de la physiopathologie des maladies génétiques du retard mental et de l'épilepsie. Nous étudions plusieurs gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ces gènes, et des protéines pour lesquelles ils codent, dans le système nerveux central (SNC) et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies. Pour cela, nous utilisons des modèles souris (transgéniques ou spontanées).

Nos activités portent une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptés. Les interventions chirurgicales, réalisées sous anesthésie et en présence d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. Afin d'éviter une souffrance de la souris (et dans le cas d'une perte de poids de plus de 10 % ou de difficulté à mettre bas) les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes de mise-a-mort adaptés.

Des travaux précédents nous ont aidés réduire le nombre d'animaux requis (1216), afin de générer des résultats robustes:

- Un de nos objectifs est de caractériser le phénotype de cellules neuronales dérivées de souris mutantes comparées aux souris contrôles, afin de mieux comprendre la fonction de chaque gène et d'élucider les mécanismes pathogéniques associés aux mutations (sont impliquées 54 animaux adultes). La plupart des gènes que nous étudions sont spécifiquement exprimés dans le SNC et ne sont pas exprimés dans les lignées cellulaires, d'où la nécessité de dériver des cultures primaires de cellules neuronales. Des travaux antérieurs nous ont permis d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle.

- Certaines lignées de souris mutantes sont donc déjà établies, représentant des modèles d'épilepsie ou de déficits intellectuels, pour lesquels il est important de continuer la caractérisation afin d'éclaircir la physiopathologie. Pour cela, nous analyserons l'anatomie et la morphologie du SNC de ces souris mutantes, par des méthodes d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie (sont concernés 116 animaux adultes et 46 portées, pour un nombre total d'environ 484 animaux). L'objectif est d'identifier et d'étudier les anomalies du SNC associés aux inactivations de gènes d'intérêt. Des travaux précédents nous ont permis de valider l'analyse des régions cérébrales considérées avec une excellente reproductibilité et donc de réduire le nombre d'animaux requis.

- L'étude de mécanismes physiopathologiques liés aux déficits de ces différents gènes, et réalisée par les approches ci-dessus, est nécessaire pour établir des stratégies de correction de phénotype. Nous tenterons d'améliorer le phénotype pour un modèle de souris épileptique, en utilisant une stratégie efficace d'ablation d'une population de cellules nerveuses aberrantes (sont concernés 22 animaux adultes et 10 portées, pour un nombre total d'environ 102 animaux). Il est probable que cette stratégie réduira l'hyperexcitabilité cellulaire et restaurera une activité neuronale normale chez ces souris.

- L'inactivation de gènes de manière locale et aigüe chez la souris, in utero ou dans le cerveau postnatal, a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Cette approche est donc la méthode de choix quand nous testons la fonction de nouveaux gènes identifiés par la génétique humaine. Des travaux précédents, nous ont permis de valider les techniques d'inactivation et donc de réduire le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Grâce à cette méthode nous testerons le rôle de 5 nouveaux gènes (sont impliqués 216 animaux adultes et 48 portées, pour un nombre total d'environ 576 animaux), qui éclaircirons les voies biochimiques essentielles pour le développement cortical.

527- Les maladies auto-immunes sont dues à un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants normaux de l'organisme. Dans les pays développés, les maladies auto-immunes touchent environ 8% de la population avec une forte prévalence pour les femmes (78%). Ces maladies évoluent de façon chronique

tout au long de la vie, avec des phases de crises et de rémissions. A ce jour, plus de 80 maladies auto-immunes ont été décrites. Parmi les plus fréquentes, on peut citer la sclérose en plaque et la polyarthrite rhumatoïde. Les principaux traitements sont basés sur les médicaments appelés immunosuppresseurs. Les plus courants sont les corticoïdes, le cyclophosphamide, le methotrexate, l'azathioprine, la cyclosporine et plus récemment le mycophenolate mofétil. Malheureusement, ces traitements entravent également les réponses immunitaires physiologiques destinées à lutter contre les infections et ont d'autres effets secondaires potentiellement sérieux qui sont propres à chacun. Le but de la recherche médicale est de mettre au point des traitements efficaces avec moins d'effets secondaires. La recherche est actuellement concentrée sur le développement de thérapeutiques dites « ciblées » c'est à dire qui vont interférer avec des fonctions précises de la réponse immunitaire, fonctions qui sont impliquées dans la pathogénie de la maladie. Différents modèles animaux existent et sont validés par la communauté scientifique. Ces modèles ont permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques des maladies auto-immunes et permettent ainsi de développer de nouveaux traitements. Ils sont en général basés sur la stimulation d'une réponse immunitaire connue de la maladie. Par exemple, une stimulation des anticorps dirigés contre la gaine de myéline dans le cas de la sclérose en plaque. Stimulation de l'anticorps dirigé contre le collagène type II (constituant à 95 % des collagènes du cartilage normal) dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 15 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 200 souris et 1250 rats est envisagée.

528- La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche 1% de la population âgée de plus de 60 ans et 4% de la population des personnes de plus de 80 ans. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative du système nerveux central qui progressivement entraîne des troubles moteurs (tremblements, rigidité musculaire, impossibilité ou ralentissement des mouvements). Comme d'autres maladies neurodégénératives, il n'y a pas de traitement capable de stopper ou guérir la maladie. Les traitements qui existent sont purement symptomatiques. La L-DOPA (Levodopa) est le traitement le plus utilisé. Elle compense la diminution ou l'absence du neurotransmetteur dopaminergique lié à la neurodégénérescence. Toutefois, le traitement à la L-DOPA entraîne des effets secondaires sérieux tels que dyskinésie (mouvements anormaux involontaires), désorientation et confusion, etc... Plusieurs voies de recherche sont en cours pour le traitement de la maladie de Parkinson et incluent par exemple la thérapie génique, la greffe de neurones et les médicaments neuroprotecteurs. Les modèles animaux demeurent incontournables lors de développement de nouvelles spécialités pharmaceutiques car aucun autre modèle ne peut se substituer à la complexité de l'organisme animal. Un des modèles animaux (rat) le plus utilisé dans la recherche sur la maladie de Parkinson est basé sur une lésion unilatérale et sélective par injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA).

Cette injection affecte chez le rat la même zone cérébrale que les patients atteints de la maladie de Parkinson et permet de mimer certains de leurs symptômes. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 250 rats est envisagée.

529- La neuropathie périphérique désigne l'ensemble des maladies des nerfs périphériques issus de la moelle épinière. Elles sont fréquentes et surviennent chez environ 2,4% de la population. Le taux d'incidence augmente avec l'âge. D'une grande diversité étiologique, les neuropathies périphériques peuvent être inflammatoires, infectieuses, héréditaires ou acquises (métaboliques, toxiques ou traumatiques). Les troubles fonctionnels peuvent être moteurs (paralysie, amyotrophie, fasciculations, diminution ou abolition des réflexes ostéotendineux...) ou sensoriels (paresthésies, douleurs, troubles proprioceptives). Il n'existe aucun traitement satisfaisant contre les symptômes des neuropathies périphériques ou pour soigner les dommages aux nerfs. Bien que des médicaments palliatifs comme l'amytriptyline ou la gabapentine puissent s'avérer efficaces chez certaines personnes, ils ne donnent aucun résultat chez d'autres. Une grande partie des recherches effectuées sur les neuropathies périphériques a pour but de bien cerner tous les mécanismes qui conditionnent la régénérescence des nerfs périphériques afin de développer des thérapies capables de restaurer la fonction du nerf endommagé.

D'autre part, la recherche continue à développer des médicaments plus efficaces pour le traitement des symptômes des neuropathies périphériques. Les modèles animaux restent incontournables surtout pour valider les concepts thérapeutiques précliniques. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 12 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins et nous avons systématiquement une réflexion portant sur la qualité de récupération des animaux. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 2500 souris et 1000 rats est envisagée.

530- Le trouble cognitif est un trouble mental fréquent au cours du vieillissement normal puisqu'il touche jusqu'à 50 % des sujets âgés de plus de 55 ans. Les principaux types de troubles cognitifs marqués sont le délire, la démence, la perte d'attention et l'amnésie. Les cas les plus sévères sont associés aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington où ils constituent un vrai problème socio-économique. A l'heure actuelle, il y a seulement quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) reconnus officiellement pour le traitement des symptômes cognitifs. Les effets de ces molécules restent modestes et ne sont pas dénués d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. Ainsi, la recherche vise à trouver un médicament plus efficace sans effets secondaires majeurs et à disséquer les mécanismes conduisant aux troubles cognitifs. A l'heure actuelle, le criblage des molécules aux effets procognitifs ne peut se faire que sur les modèles basés sur la capacité d'apprentissage et de mémoire chez le rat ou la souris non transgéniques ayant un dysfonctionnement mnésique naturel lié au vieillissement ou induit artificiellement. En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10-15 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé. Par exemple, nous favorisons le test de plusieurs conditions expérimentales en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes témoins. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 25000 souris et 1500 rats est envisagée.

531- La complexité de la connectivité du réseau neuronal impliqué dans les interactions multisensorielles, qui comprend des voies corticales et thalamo-corticales ainsi que la diversité des interactions observées à travers le thalamus, les aires corticales sensorielles (à des stades précoces) ou associatives, favorise un système distribué dont l'activation est probablement adaptée à certaines situations comportementales. Mon projet de recherche vise à déterminer la nature de ce réseau neuronal en fonction de différentes tâches multisensorielles (passive, détection, localisation, reconnaissance d'objets) à la fois chez l'homme et chez le singe (2 à 4 animaux seront impliqués). Cette approche multidisciplinaire me permettra d'aborder aussi bien les aspects comportementaux et cognitifs que les aspects neurophysiologiques et le code neuronal sous-tendant les interactions multisensorielles grâce à l'imagerie cérébrale et à l'électrophysiologie notamment. Seule une étude transversale et systématique pourra fournir une meilleure compréhension des interactions multisensorielles.

532- L'immunothérapie spécifique d'antigène de tumeur constitue une approche thérapeutique, complémentaire des traitements classiques en oncologie que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans ce cadre, deux produits d'immunothérapie, dénommés les candidats, ciblant des antigènes exprimés par des tumeurs, ont été générés. Ils visent à induire des réponses immunitaires spécifiques de cellules tumorales et à stimuler les défenses naturelles de l'organisme. Les candidats sont en cours de développement clinique avancé. Le projet s'inscrit dans le cadre de la caractérisation de l'activité biologique des candidats, aussi appelé test de « potency ». L'utilisation de modèles animaux s'impose par la nature du produit d'immunothérapie qui ne possède pas d'activité directe sur la tumeur après son administration, mais vise à générer ou amplifier des réponses immunitaires conduisant à la destruction des tumeurs.

Dans le cadre du développement de ces tests de « potency », deux approches expérimentales sont menées. Dans la première, dite prophylactique, le candidat est administré aux animaux pour induire une réponse immunitaire spécifique et ensuite des cellules tumorales sont administrées pour générer des tumeurs. Dans la seconde

approche, dite thérapeutique, les cellules tumorales sont administrées en premier lieu, suivi des injections du candidat à tester. La survie des animaux est enregistrée et constitue le critère permettant d'apprécier l'activité des produits testés. Le nombre d'animaux par groupe expérimental est de 20. Un nombre maximal de 1000 animaux est envisagé pour ce projet. Le projet inclut des études dites de comparabilités (avec des tests d'activité in vitro afin de remplacer les études sur les animaux. Les résultats issus de ce projet font parti des essais de qualité des candidats avant les essais cliniques.

533- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez le primate vigile après l'administration du candidat-médicament (6 animaux par étude ; soit un nombre prévisionnel maximum de 60 animaux sur 5 ans). Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 48 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (chien, primate non-humain).

Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

534- L'objectif de ce projet est de développer des anticorps monoclonaux qui rentreront dans la composition de trousse diagnostique utilisées en santé humaine.

Les anticorps monoclonaux, que l'on peut produire in-vitro, permettent de s'affranchir de l'utilisation d'anticorps polyclonaux qui obligent à avoir recours de façon régulière à un grand nombre d'animaux. L'utilisation d'anticorps monoclonaux s'inscrit donc bien dans la démarche de « Réduction », qui consiste à limiter au maximum le nombre d'animaux à utiliser.

Ces anticorps monoclonaux sont obtenus en immunisant des animaux avec la molécule contre laquelle nous souhaitons obtenir des anticorps.

Pour ce projet nous utilisons exclusivement des souris. La souris est l'animal de référence pour le développement d'anticorps monoclonaux, son utilisation est très largement documentée. De plus, c'est un animal pour lequel nous possédons une grande connaissance acquise au cours de nos nombreuses années de pratique.

Pour chaque projet, nous utilisons le nombre minimum d'animaux nous permettant de nous affranchir au mieux de la variabilité biologique observée lors de la réponse immunitaire d'un animal vis-à-vis d'un antigène.

Sur la base de l'activité de notre laboratoire pour ces dernières années, le nombre d'animaux utilisés chaque année est d'environ 150. Le nombre total d'animaux qui pourront être utilisés pendant les 5 années pour lesquelles ce projet est demandé est donc au maximum de 750 souris.

Nos animaux sont hébergés et soignés quotidiennement dans des conditions conformes à la réglementation. Pour les différents protocoles de ce projet, la notion de « Raffinement » a été prise en considération. Des mesures visant à limiter la douleur subie par l'animal et assurer son confort, ont été prises: définition de point-limites, amélioration des conditions de vie par l'enrichissement de l'environnement, etc...

535- Contexte scientifique

L'état de choc se définit, chez un patient en état critique, par une baisse de la pression artérielle, entraînant une baisse de la perfusion des organes et notamment de leur alimentation en oxygène. Ceci peut être le résultat soit d'une hypovolémie vraie (perte sanguine, digestive ou capillaire), ou d'une hypovolémie relative (vasodilatation induite par les agressions allergiques ou microbiennes).



La phase initiale de la réanimation d'un état de choc consiste à apporter, par perfusion, de grandes quantités (jusqu'à plusieurs litres) de liquide afin de rétablir une pression artérielle suffisante pour assurer l'oxygénation des organes vitaux.

Les recommandations actuelles préconisent l'utilisation première de solutés cristalloïdes. Le plus simple et le plus usité est le Soluté Salé Isotonique (NaCl 0,9%), très riche en Chlore. Il existe d'autres solutions cristalloïdes dites "balancées", se voulant plus proche des concentrations sanguines en chlore, qui le remplacent par d'autres anions, le lactate (Ringer Lactate<sup>®</sup>) ou le gluconate et l'acetate (Plasma Lyte<sup>®</sup>).

Objectif de l'étude

Le but est donc de comparer les effets sur la fonction rénale de ces trois solutions, de concentration variable en chlore, utilisées comme solutés de remplissage chez des rats en état de choc septique.

Méthodologie

Les connaissances actuelles sur le sujet ne permettent pas une compréhension suffisamment fine des phénomènes pour envisager une étude chez l'homme, et le choc septique est une pathologie trop complexe pour l'étudier sur des modèles d'organes isolés.

En effet seule l'étude des molécules d'intérêt sur un modèle « intégré » approchant au mieux toute complexité de la maladie chez l'homme sont à même de valider l'efficacité de celles-ci avant de les tester chez l'homme. Cette étape in vivo est donc irremplaçable.

Nous aurons recours à des Rats femelles Wistar adultes, répartis en trois groupes, correspondant aux trois solutions, contenant chacun 40 rats en état de choc et 20 rats contrôle soit 180 rats au total.

Ce nombre important est nécessaire, d'une part pour s'affranchir de la grande variabilité de réponse aux états de choc et d'autre part pour pouvoir recourir à des tests de statistiques dit "paramétriques" plus performants (test de Student ou d'Anova) pour comparer les groupes et diminuer ainsi le risque de ne pas pouvoir conclure à l'issue de l'étude.

L'état de choc sera induit par une péritonite provoquée ponction et ligature du Caecum. L'ensemble des manipulations sera effectué sous anesthésie générale, induite par inhalation d'Isoflurane et entretenu par injection de Kétamine. De plus tous les gestes invasifs seront précédés d'une anesthésie locale par injection sous cutanée de Xylocaïne.

A la fin du protocole les rats seront euthanasiés par injection d'une dose létale de Pentobarbital, à des fins de prélèvements visant à une meilleure compréhension des phénomènes impliqués dans la toxicité rénale potentielle du chlore.

Résultats attendus

Cette étude, préclinique peut, soit démontrer un bénéfice à la diminution de l'utilisation du chlore et alors ouvrir à une évaluation clinique chez les patients souffrant d'un choc septique, soit ne pas monter d'avantage au recours aux solutions balancées et ainsi conforter l'attitude actuelle de recours privilégié au NaCl 0,9%.

536- Notre équipe de recherche est spécialisée dans l'étude de molécules anticancéreuses ciblant les microtubules. Les microtubules jouent un rôle fondamental dans les fonctions de division, migration et de différenciation cellulaires, phénomènes responsables du développement du cancer. Ils représentent ainsi une cible thérapeutique de choix pour certains agents chimiothérapeutiques : les agents anti-microtubules. Notre équipe est focalisée sur l'étude de la protéine EB1 (End-Binding protein 1), une protéine associée aux microtubules, qui gouverne ses principales fonctions dans la cellule. Nous avons récemment montré les propriétés oncogéniques d'EB1 dans le glioblastome in vitro et in vivo et sa valeur de mauvais pronostic chez les patients. De plus, une valeur prédictive de l'expression d'EB1 de réponse aux Vinca-alcaloïdes, au niveau cellulaire puis confirmée sur l'animal, a été démontrée. Nous avons montré que cette réponse était également associée à des modulations de certaines modifications post-traductionnelles d'EB1.

Nous souhaitons maintenant étendre cette étude à la réponse anti-tumorale à d'autres agents anti-microtubules en comparaison avec des agents anticancéreux de référence, dans le glioblastome, afin d'élargir le panel des molécules anticancéreuses utilisables chez l'homme. Pour cela, nous disposons de différentes lignées tumorales de glioblastome où l'expression d'EB1, ou de ses modifications post-traductionnelles sont modulées. L'objectif est, après validation in vitro, de déterminer sur un modèle animal quelle sont les molécules anticancéreuses pour lesquelles l'expression d'EB1 ou de ses isoformes est un marqueur prédictif adéquat. Cette étape de validation in vivo est indispensable avant toute évaluation clinique chez le patient.

Précédemment, pour démontrer la valeur prédictive de l'expression d'EB1 dans la réponse aux Vinca-alcaloïdes dans le glioblastome, nous avons utilisé le modèle de souris nude, animaux dans lesquels nous avons greffé par stéréotaxie des cellules de glioblastome. Il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode qui pourrait se

substituer à l'expérimentation animale dans ce domaine. Ce modèle largement décrit dans la littérature, nous a permis de démontrer que plus les tumeurs exprimaient EB1, plus la réponse anti-tumorale était efficace. Nous souhaitons utiliser ce même modèle expérimental pour tester l'effet de la surexpression d'EB1 (ou de ses isoformes) sur la réponse à d'autres drogues. Des greffes orthotopiques de lignées de glioblastome dont l'expression d'EB1 ou de ses isoformes est modulée ou non seront réalisées afin de tester l'implication de cette protéine dans la réponse anti-tumorale. Quatre groupes seront constitués : animaux comportant un glioblastome contrôle ou dont l'expression d'EB1 est modulée, traités ou non avec un agent anticancéreux. Un minimum d'animaux (n=3) nécessaire aux conclusions statistiques sera euthanasié à trois temps différents dans les différents groupes (soit au total 36 animaux). Les cerveaux seront disséqués et le volume tumoral déterminé par coloration histologique et analyses morphométriques. En parallèle, l'évolution du poids des animaux des différents groupes (n=8 par groupe, soit 32 animaux au total) sera analysée

537- Les anomalies précoces du développement cérébral sont la cause de maladies malformatives du cerveau plus ou moins sévères, et peuvent aussi avoir des conséquences pathologiques à long terme, telles que épilepsie, autisme, etc. Ces anomalies peuvent avoir des causes diverses, génétiques (mutations dans divers gènes importants pour le développement du cerveau) ou infectieuses notamment - l'infection au cours de la grossesse par le cytomégalovirus (CMV) étant la cause la plus fréquente de pathologie neurodéveloppementale chez l'homme.

L'étude de modèles animaux dans lesquels l'inactivation d'un gène donné, reproduit certains des aspects cellulaires, moléculaires ou comportementaux, est classique et permet d'appréhender la physiopathologie associée à la maladie correspondante chez l'homme, et d'en proposer de nouvelles voies thérapeutiques potentielles ; elle permet aussi d'apprécier les grands mécanismes physiologiques de développement cérébral chez l'homme. De même, la création d'un modèle pertinent d'infection congénitale chez l'homme, doit permettre d'en mimer et d'en comprendre certains des mécanismes, par essence encore très mal connus.

Notre projet vise à aborder ces deux aspects mécanistiques : d'une part à travers la création et l'étude de divers modèles convergents d'inactivation de gènes (Srx2, Atat-1, Dcx, Grin2a) impliqués dans le développement et/ou la maturation du cortex cérébral, visant in fine à proposer et tester des stratégies d'intervention précoce, afin de prévenir ou d'atténuer les conséquences épileptiques et non-épileptiques futures, post-natales ; d'autre part à travers la création et l'étude d'un modèle d'infection congénitale cérébrale par le CMV de rat, afin de comprendre certaines des causes, des mécanismes initiaux et des conséquences possibles chez l'homme.

Nous utiliserons notamment dans ce projet la technique d'injection dans les ventricules cérébraux d'embryons de rat, soit de constructions permettant après électroporation d'inactiver les gènes d'intérêt, et/ou d'en restaurer l'activité, soit de particules virales (CMV) afin d'en suivre le processus infectieux dans le cerveau. Pour chaque modèle, des analyses prénatales et postnatales à différents stades du développement et de la maturation cérébrales seront réalisées à différents niveaux, en limitant au maximum le nombre d'animaux nécessaires (couplage des analyses lorsque cela est possible). Ce projet utilisera 290 rates gestantes, qui permettront la génération de 810 embryons (stades prénataux) et la naissance de 440 ratons (stades post-nataux). Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des rates gestantes comme de leur progéniture, sera évalué quotidiennement ; ainsi, croissance staturo-pondérale, aspect général, comportement seront observés

538- Les produits animaux peuvent faire l'objet de différentes contaminations par des molécules néfastes pour la santé humaine et provenant de différentes sources : résidus de pesticides utilisés en traitement des cultures des matières premières intégrées dans l'alimentation animale (blé, maïs, soja, colza, tournesol ...), résidus de produits de traitements vétérinaires (antibiotiques, anticoccidiens) lorsque les délais de retrait ne sont pas respectés, micro-contaminants de l'environnement (PCBs, dioxines, métaux lourds ...), toxines produites par les moisissures (mycotoxines) pouvant se développer sur les matières premières utilisées dans l'alimentation animale en particulier lorsque celles-ci ne peuvent pas être traitées par des antifongiques, ce qui est par exemple le cas pour les cultures bio. L'objectif de la présente étude est d'exposer à différents contaminants, alimentaires ou environnementaux, et en conditions parfaitement contrôlées, 81 poulets à croissance lente afin 1/ d'évaluer les taux de transfert de ces contaminants (molécules mères et métabolites) dans les matrices cibles (chair, foie, gras) et 2/ d'identifier des biomarqueurs hépatiques ou sanguins sensibles à l'exposition des animaux à ces contaminants. Ces biomarqueurs pourront ensuite être utilisés par les laboratoires lors de contrôle de la qualité sanitaire des produits carnés.

Les muscles (filets) de ces animaux seront également collectés en vue d'étudier l'impact de la cuisson et de la digestion sur la biodisponibilité des contaminants.

539- Le mélanome de la choroïde est la plus fréquente des tumeurs oculaires de l'adulte. Dans 50% des cas les patients développent des métastases dont pour la majorité sont situés au niveau du foie. Pour la maladie métastatique, les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité.

Nous avons établi des xénogreffes de tumeurs directement à partir de pièces opératoires de patients sur les souris immunodéprimées.

Nous avons mis en évidence la dérégulation d'une ou plusieurs voies responsables de la prolifération anormale des cellules dans les tumeurs. Notre but est d'évaluer l'efficacité antitumorale des molécules capables de bloquer une de ces voies ou différentes protéines de la même voie seules ou associées entre elles..

La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité des différents médicaments seuls ou en association. Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est de 470 souris SCID.

La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité des médicaments sur les xénogreffes obtenues à partir des tumeurs humaines. Le nombre de souris pour les expériences d'efficacité est de 5130.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

540- L'apoptose est une mort génétiquement programmée essentielle pour la cellule. La dérégulation de la machinerie apoptotique entraîne d'importantes maladies telles que le cancer. Parmi les protéines clés de déclenchement de l'apoptose se trouve la caspase-9. Cette caspase est sous forme inactive quand elle est associée à une autre protéine, la PP2A, empêchant ainsi l'apoptose de la cellule. L'une des hypothèses à l'origine de ce projet est de briser l'interaction de caspase-9 et PP2A et conduire la cellule tumorale vers l'apoptose (= la mort).

Nous proposons d'utiliser des peptides pénétrants capables d'empêcher spécifiquement l'interaction caspase-9/PP2A dans les cellules tumorales. Ces peptides ont l'avantage d'entrer facilement dans la cellule sans endommager la membrane cellulaire et atteindre leur cible. Les expériences faites avec DPT-C9h ont montré une certaine efficacité antitumorale sur les cellules cancéreuses in vitro et sur les tumeurs humaines greffées sur souris. L'inconvénient de ce peptide c'est qu'il se dégrade rapidement dans le sang. Afin d'augmenter la stabilité de ce peptide, nous avons développé des mutants de celui-ci. L'efficacité thérapeutique de 2 peptides mutants va être évaluée sur des modèles de xénogreffes.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre de souris utilisées est de 360 souris. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences

541- Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon. A des stades avancés de la maladie, les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité.

Nous avons établi des modèles de xénogreffes de tumeur de l'ovaire, obtenus directement à partir des fragments de tumeurs de patients implantées sur les souris immunodéprimées.

La présence d'une protéine, est mise en évidence à la surface des cellules cancéreuses de l'ovaire. Notre but est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale d'un anticorps reconnaissant spécifiquement cette protéine.

La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité de l'anticorps seul ou associé à la chimiothérapie. La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité de l'anticorps sur les xénogreffes obtenues à partir des tumeurs ovariennes humaines.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre de souris utilisées est de 496 souris. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

542- Dans les cellules normales, à chaque division cellulaire, les extrémités des chromosomes diminuent en taille jusqu'à conduire à l'arrêt de la division et la mort de la cellule. Dans les cellules cancéreuses, une enzyme, la télomérase, est capable de compenser ce raccourcissement, permettant ainsi la division importante de ces cellules. Cette enzyme étant inactive dans les cellules normales, son ciblage permet d'attaquer spécifiquement des cellules cancéreuses. Le TOxaPy est une nouvelle molécule qui bloque l'action des télomérases. Notre projet

consiste à tester cette molécule sur les xénogreffes d'origine humaine portées par des souris immunodéficientes. Ces xénogreffes proviennent de 3 pathologies différentes pour lesquels il y a un manque de médicaments efficaces. Il s'agit d'un sous type de cancer du sein appelé cancer de sein triple négatif, le cancer de poumon non à petites cellules et le cancer de l'ovaire.

La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité de TOxapy.

Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est de 14 souris immunodéficientes.

La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité des médicaments sur les xénogreffes différentes obtenues à partir des tumeurs humaines. Le nombre de souris pour les expériences d'efficacité est de 270.

Pour l'ensemble de ces expériences, le nombre de souris utilisées est de 284 souris. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

543- Le contrôle de la balance prolifération/différenciation est essentiel à l'organogenèse et à l'homéostasie tissulaire. Au cours du développement du système nerveux central, une dérégulation de cette balance associée à une différenciation prématurée induit des microcéphalies alors qu'une prolifération incontrôlée génère des tumeurs. Le décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent cette balance est donc essentiel non seulement en recherche fondamentale mais également peut ouvrir de nouvelles perspectives pour le diagnostic et l'innovation thérapeutique. La mise en place du système nerveux met en jeu un réseau génétique extrêmement complexe impliquant à la fois des facteurs de transcription tel que Pax6 ou neurogenin1/2 (Ngn1/2) et des éléments régulateurs du cycle cellulaire tels que CDC25B.

Le but de notre projet est d'élucider comment, au sein d'une cellule souche neurale, l'expression des facteurs de transcription neurogéniques est intégrée à la machinerie de la cinétique du cycle cellulaire pour contrôler le destin cellulaire.

Des données récentes montrent que la cinétique du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux est un élément clef dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation chez les Vertébrés. Nous avons récemment montré que la perte de fonction de la phosphatase CDC25B, un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans le contrôle de l'entrée en mitose, induit une augmentation du nombre de progéniteurs en prolifération et une réduction du nombre de neurones, associées à un rallongement de la phase G2. Pour continuer sur ce sujet, nous avons généré une souris dont le gène *cdc25B* est invalidé et allons analyser à la fois le développement des progéniteurs neuraux et des neurones en cours de différenciation dans le tube neural d'embryons de souris et dans des cerveaux de souris adulte.

En outre, nous étudions l'intégration de l'expression des facteurs de transcription de patterning et des facteurs de transcription neurogéniques dans le contrôle de la cinétique du cycle cellulaire. Nous avons récemment montré que le facteur de transcription Ngn2 a une action rapide sur l'expression des gènes des cyclines impliquées dans la progression en phase G1 et S du cycle cellulaire. Ces résultats suggèrent que les facteurs de transcriptions impliqués dans le maintien de l'état souches des progéniteurs (Pax6) ou impliqués dans la différenciation des neurones (Ngn1/2) régulent très précocement l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Nous allons analyser l'effet de la perte de fonction de ces deux gènes sur la cinétique du cycle cellulaire et sur la prolifération des précurseurs neuraux et la différenciation des neurones dans deux contextes différents : le tube neural d'embryon et dans le cerveau adulte.

Il est maintenant clair que la mise en place des cellules souches nécessite des interactions précises avec leur niche et donc aucune expérience réalisée sur des cellules en culture ne peut remplacer les observations réalisées sur les embryons ou sur les animaux adultes. Pour disséquer le rôle des gènes que nous étudions, nous introduisons des mutations génétiques ciblées dans la souris puis nous étudierons le développement du système nerveux dans le contexte de l'embryon entier. En parallèle, nous réaliserons des études anatomiques et comportementales chez la souris adulte afin de relier les anomalies du développement ou de l'homéostasie avec des altérations du comportement. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir une bonne reproductibilité de chaque résultat. Le nombre estimé d'animaux utilisés au cours de ce protocole est de 1040 animaux.

544- Ce projet de recherche concerne l'excitabilité neuronale et la connectivité synaptique dans la région hippocampique et parahippocampique. Cette région du cerveau joue un rôle important pour l'orientation dans l'espace et en particulier pour le codage neuronale de la direction de la tête. Le fonctionnement physiologique est encore peu étudié au niveau de l'organisation du microcircuit parahippocampique. Pourtant on sait que dans

certaines maladies neurologiques, comme l'épilepsie ou des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, les régions hippocampique et parahippocampique sont atteintes de façon précoce. Une meilleure compréhension du fonctionnement du réseau pourra donner des outils pour un diagnostic précoce ou pour le traitement de la pathologie neurologique.

Spécifiquement nous allons étudier 1. Le traitement des afférences dans le présubiculum 2. L'intégration synaptique et les courants voltage-dépendants 3. Le rôle des interneurons inhibiteurs 4. Les signaux extracellulaires: multi-unités et potentiels de champs

Les études seront menées sur les tranches du tissu cérébral de rongeur (souris et rat), qui sont étudiés avec les outils d'électrophysiologie et de la microscopie, après l'extraction du cerveau des animaux. Ces tranches sont conservées dans une solution similaire à celle du fluide cérébrospinal. Les cellules, synapses et réseaux gardent une activité physiologique pendant les 6-8 heures que durent nos expériences.

Les souris et les rats possèdent un cerveau assez complexe de petit mammifère, et notamment la région hippocampique est une partie phylogénétiquement ancienne du cerveau qui ressemble sous beaucoup d'aspects à celui des humains. Nous n'avons donc pas besoin de travailler sur des primates. En revanche, il est indispensable que le tissu cérébral soit conservé avec ses connexions entre cellules, c'est pourquoi une culture cellulaire ne peut pas être substituée. Avant le sacrifice des animaux, pour certaines expériences, des sous-populations de neurones sont marqués par injection intracérébrale. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utilisons 6 tranches de cerveau par animal, qui sont pris depuis les 2 hémisphères. Nous pouvons ainsi espérer d'obtenir au moins 1 enregistrement depuis chaque animal, et dans les meilleurs des cas jusqu'à 6. Même si nous avons besoin de données de haute qualité et malgré le fait que le niveau de complexité technique des expériences est très élevé, on peut ainsi optimiser le nombre d'expériences par rapport au nombre d'animaux utilisés. Comme les expériences d'anatomie peuvent parfois être faites sur les mêmes tranches de cerveau qui ont servi pour les enregistrements, on optimise encore une fois les données obtenues depuis chaque animal. Nous estimons d'utiliser ~ 275 animaux sur 5 ans.

Bien que nous avons besoins des animaux pour obtenir les données brutes, nous les utilisons ensuite pour des analyses poussés sur ordinateur. D'autres recherches qui utilisent la modélisation pourront ensuite en découler et dans le futur produire des meilleurs modèles des processus biologiques et pathologiques.

545- L'obésité est actuellement décrite comme l'épidémie mondiale du 21ème siècle et représente un problème majeur de santé publique. De nombreuses études démontrent que l'inflammation du tissu adipeux est un des processus biologiques majoritairement perturbé; ce phénomène contribue à la progression de l'obésité et à ces complications métaboliques et cardiovasculaires. Le tissu adipeux apparaît comme l'organe majeur responsable du développement de l'obésité et des complications. Il existe un besoin urgent de comprendre les mécanismes inflammatoires dérégulés chez l'obèse et de les contrôler. Ces processus inflammatoires font l'objet d'une recherche intense dans le domaine de l'obésité, cependant les mécanismes inflammatoires au niveau du tissu adipeux ne sont pas complètement identifiés. L'objectif de mon projet de recherche est d'investiguer les mécanismes de régulation de l'inflammation spécifiquement dans le tissu adipeux humain (adipocytes et macrophages). Mes études ont récemment proposé un nouveau concept de régulation de l'inflammation par un complexe répresseur. Ces études nous ont amenés à émettre l'hypothèse que ce complexe pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation de l'inflammation du tissu adipeux dans l'obésité humaine.

Pour valider mon hypothèse, mon projet a pour but de déchiffrer leurs mécanismes moléculaires d'action et leurs fonctions physiologiques de ce complexe répresseur.

546- Un certain nombre d'études indique une détérioration de la fonction de reproduction de l'homme au cours des récentes années, et montre en particulier une augmentation de malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin. Les expositions à des substances chimiques présentes dans notre environnement ont été mises en cause, notamment des pesticides. D'après des études menées chez les rongeurs, ces anomalies pourraient trouver leur origine dans une perturbation du développement de l'appareil reproducteur durant la vie intra-utérine. Cette période est considérée comme particulièrement vulnérable aux toxiques.

Cette question est devenue une préoccupation de plus en plus importante dans le monde scientifique et médical, mais aussi pour des instances réglementaires et politiques et la sphère publique. Une des stratégies pour détecter les substances néfastes et explorer leurs mécanismes d'action est de rechercher les effets précoces sur les testicules des fœtus de rat, après exposition des mères pendant la gestation.

L'objectif général de notre projet est d'évaluer l'impact d'une exposition in utéro à des insecticides sur le développement de l'appareil reproducteur mâle, qui est une cible potentielle pour ces substances, et de fournir

une évaluation satisfaisante d'un niveau de dose sans effet adverse. Le projet est original car cette évaluation n'a pas, à ce jour, été rapportée dans la littérature scientifique. Il entre dans l'un des axes de recherche du laboratoire, depuis plusieurs années à savoir l'étude de la toxicité pour le développement de substances chimiques chez le rat.

Nous appliquerons des modèles expérimentaux de dépistage validés, déjà utilisés par notre laboratoire et/ou différentes équipes mondiales. Ils permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés et/ou la durée du traitement comparativement aux essais standards de toxicité pour le développement.

Ces travaux devraient apporter des informations nouvelles sur les dangers associés à ces insecticides. Les évaluateurs et les gestionnaires de risques pourront s'appuyer sur ces connaissances lors de leurs prises de décision (ex : mise en place de mesures renforcées de protection durant la grossesse).

Le nombre estimé d'animaux utilisés pour le projet est de 1830 rats Sprague-Dawley femelles et 175 rats Sprague-Dawley mâles.

547- Au cours des 2 dernières décennies, l'utilisation de nouveaux médicaments de chimiothérapie, associée au développement de molécules permettant la réduction des effets secondaires induits par la chimiothérapie a considérablement amélioré le traitement et la prise en charge des patients atteints de cancer. A cet égard, les agents stimulant la formation de globules rouges (l'érythropoïèse), connus comme ESA (agents stimulants l'érythropoïèse), avec comme chef de file l'érythropoïétine (EPO), ont révolutionné la prise en charge de l'anémie, considérée comme l'un des effets secondaires hématologiques les plus fréquents. Cependant, plusieurs méta-analyses récentes ont signalé une augmentation significative du risque de thrombose et de réduction de la survie globale associée à un traitement par l'EPO et ceci indépendamment du type de cancer ou du protocole de chimiothérapie.

En dépit des efforts énormes fournis ces dernières années par la communauté scientifique et l'utilisation de nombreux modèles expérimentaux, aucun mécanisme permettant d'expliquer l'augmentation de la progression des tumeurs liée à l'EPO, n'a pu être approuvé. Nous pensons que cet effet peut-être dû en partie à un effet de l'EPO sur le système de défense de l'organisme, le système immunitaire. L'objectif de ce projet est donc d'explorer les aspects immunologiques de l'activité de l'érythropoïétine, à la fois à l'état basal dans différentes souches de souris et également après modulation par l'EPO. Les marqueurs de susceptibilité seront évalués dans le but d'identifier les voies spécifiques liées à un effet immunosuppresseur éventuel de l'EPO et leur interrelation avec la différenciation érythroïde. Afin de répondre à cette question, des modèles murins traités à l'EPO seront évalués (nombre estimé de souris : 810 sur trois ans). Nous utiliserons également une approche originale, où l'EPO endogène est complètement neutralisée.

548- Le présent programme vise à mieux comprendre la variabilité en terme de mortalité au cours du gavage et de qualité technologique des foies gras de canard en explorant l'impact des hormones surrénaliennes sur le métabolisme hépatique. Notre animal d'intérêt est le canard mulard, qui représente 95% de la production française de foie gras. Nous avons construit un programme sur la base de 3 essais qui vont permettre de répondre à 3 questions. Dans un premier temps, nous explorerons la variabilité de la réponse de l'axe corticotrope au sein d'un même lot d'animaux dont on connaît la généalogie. Dans un second temps, nous chercherons à réduire l'impact des transitions alimentaires au cours de la phase d'élevage et entre les phases d'élevage et de gavage. Enfin, nous déterminerons à quel moment se met en place la variabilité de la stéatose hépatique au cours du gavage. Pour chacun des essais, nous étudierons le métabolisme hépatique à différentes échelles (métabolites, expression des protéines et des gènes) afin d'optimiser/maximiser l'utilisation des échantillons obtenus en vue de réduire le nombre d'animaux élevés. Le nombre total d'animaux prévus pour les 3 essais est de 1200 canards mulards (soit 400 par essai) qui sont élevés dans le cadre d'une unité de production.

En ce qui concerne les conditions d'élevage/gavage, elles correspondent aux procédures rencontrées dans les élevages commerciaux de canards mulards. La procédure qui est susceptible de procurer de l'inconfort est le test de contention (procédure n°2) appliqué aux animaux âgés de 8 semaines (phase d'élevage). Un maximum de précautions sera pris pour éviter cet inconfort, comme par exemple, ne pas manipuler les animaux par les pattes.

549- En recherche fondamentale ou avancée, les produits sanguins issus d'animaux peuvent être utilisés pour des tests in vitro, des cultures de cellules sanguines, etc. Cela permet des avancées scientifiques, en limitant l'utilisation directe d'animaux en expérimentation à des procédures peu invasives et peu douloureuses, et ainsi de suivre les principes de réduction et de raffinement en expérimentation animale.

La proximité phylogénétique des primates non humains avec l'homme en fait des modèles animaux particulièrement valables pour reproduire des pathologies humaines. L'utilisation de produits sanguins de primates est donc de premier intérêt pour la recherche.

Le projet a pour but de répondre aux besoins de la communauté scientifique en approvisionnement en produits sanguins de primates non humains (*M. fascicularis*, *M. mulatta* et *C. aethiops*) pour ces travaux *in vitro*. Le projet se limite à des prélèvements sanguins sur des animaux hébergés dans notre établissement.

Les prélèvements sanguins sont effectués à la veine fémorale généralement sous anesthésie générale. Les volumes et la fréquence des prélèvements respectent les recommandations FELASA. La fréquence de prélèvement est généralement mensuelle. Le nombre de prélèvements est estimé à une moyenne de 100 par mois.

Les produits sanguins sont ensuite préparés selon les demandes (préparation de plasma, de sérum, congélation pour stockage,...) avant d'être envoyés aux centres de recherche utilisateurs.

550- Notre client travaille dans le domaine de la fabrication de tests de diagnostics pour maladies infectieuses humaines (par exemple HIV). Ces tests de diagnostics sont produits à partir d'anticorps monoclonaux, qui sont obtenus par production de liquide d'ascites chez la souris.

Nous réalisons pour notre client uniquement la préparation des souris utilisées dans ce cadre : création d'une réaction auto-immune et diminution des défenses immunitaires. Les animaux sont ensuite envoyés chez le client pour la suite des procédures.

De plus en plus de productions d'anticorps monoclonaux pour production de tests de diagnostic sont réalisées *in vitro*. Cependant, certaines de ces productions ne sont aujourd'hui pas encore réalisables *in vitro*, ce qui est le cas pour certaines des productions de ce client.

L'ensemble des nouveaux protocoles de production d'anticorps monoclonaux de ce client sont développés par des méthodes *in vitro*.

L'utilisation d'animaux pour la production de certains anticorps monoclonaux a été justifiée par notre client de manière écrite, lors du dépôt éthique de son projet. Cette justification nous a été transmise.

Le nombre de souris prévu pour ce protocole est d'environ 6000 par an.

551- Le but de ce projet consiste à développer des nanoparticules ultra-brillantes pour de l'imagerie non invasive de fluorescence. Nos travaux précédents montrent que ces nanoparticules de nature lipidique sont très bien tolérées par les cellules en culture et par les rongeurs après une injection systémique. En outre, leur taille nanométrique leur permet de traverser les pores de la nouvelle vascularisation dans l'environnement tumoral et de s'accumuler ainsi dans les tumeurs. Ces propriétés ne peuvent être observées qu'*in vivo* chez des rongeurs présentant des tumeurs induites expérimentalement et il n'existe pas de modèle *in vitro* de substitution pour ces études.

Par ailleurs, les nanoparticules peuvent présenter plusieurs autres fonctions telles que une fonction de ciblage leur permettant d'accroître leur sélectivité pour les cellules tumorales grâce à un ligand de surface ou encore une autre fonction d'imagerie (on parle de multimodalité). Dans ce projet, nous nous proposons de développer des nanoparticules multimodales en imageries de fluorescence et nucléaire et de tester leurs propriétés d'accumulation dans les tumeurs implantées dans le dos de souris Nude. Les cellules de la lignée U87MG ont été retenues car elles sur-expriment à leur surface les récepteurs alphaV-beta3, permettant dans un second volet de l'étude de tester des particules ciblantes, c'est-à-dire présentant en surface un ligand spécifique de ces récepteurs (le cRGD). L'accumulation tumorale des particules dans les tumeurs sera évaluée par imagerie non invasive de fluorescence, permettant ainsi un suivi longitudinal des mêmes souris et de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études. Au total, 24 souris seront incluses dans cette étude. Tous les efforts seront mis en œuvre par les expérimentateurs pour réduire la douleur et l'inconfort des animaux selon les recommandations en vigueur, en respectant la règle des 3R.

552- Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le rongeur (souris, rat ou cobaye), lorsque ces espèces sont utilisées au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, au cours de chaque étude, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez l'animal vigile après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (en général 4 groupes avec 3 animaux par groupe ; soit un nombre prévisionnel maximum de 2700 animaux sur 5 ans)

Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat- médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (chien, primate non-humain).

Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

553- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer une potentielle action pro-cognitive d'un produit chez le rat sur la mémoire spatiale testée dans le test de la piscine.

Au cours de chaque étude, les animaux (12 par groupe) sont traités préventivement avec le produit testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé. Les rats testés dans la procédure 1 reçoivent en plus une administration de scopolamine afin d'induire un déficit mnésique (total de 6 groupes par étude pour la procédure 1 et 5 groupes par étude pour la procédure 2, soit un nombre prévisionnel maximum de 12240 animaux sur 5 ans). Ils sont ensuite placés dans une piscine ronde dans laquelle ils doivent nager pour atteindre une plateforme immergée sous la surface. Ils sont soumis soit à 8 essais consécutifs le même jour (procédure 1) soit 2 à 4 essais par jour pendant 4 jours et un maximum de 2 essais de rétention (procédure 2). Le temps que chaque rat met pour atteindre la plateforme lors de chaque essai est enregistré.

Ce projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur la mémoire.

A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

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

Des expériences in vitro sur des cellules en culture nous ont permis de sélectionner la Quilamine HQ1-44 comme étant la plus efficace et de choisir le cancer du colon comme cible thérapeutique. Dans cette phase de développement préclinique des Quilamines, le modèle murin constitue une étape incontournable, en l'absence de méthode alternative reconnue pour évaluer l'efficacité antitumorale systémique d'une molécule chez l'animal. Nous avons lors d'une première étude démontré l'efficacité de notre molécule sur des souris nudes immunodéprimées auxquelles nous avons greffés des cellules humaines de cancer du colon..

L'objectif de ce projet est de poursuivre l'optimisation de l'efficacité antitumorale de la Quilamine en augmentant sa captation par les cellules tumorales. Cette activation est provoquée par une déplétion en polyamines. Les polyamines sont apportées soit par l'alimentation, soit par synthèse à partir de l'ornithine. La déplétion se fait donc par carence nutritionnelle et/ou en inhibant la synthèse. Cette étude sera réalisée avec des souris immunodéprimées Swiss nude femelles âgées de 6 semaines, modèles et sexe couramment utilisés pour de telles études pour minimiser les agressions entre animaux

Ce projet prévoit deux protocoles :

- Une mesure de l'efficacité antitumorale de HQ1-44 avec activation de sa captation par inhibition de la synthèse des polyamines, couplé ou non à une alimentation solide carencée en polyamines.
- Une mesure de l'efficacité antitumorale de HQ1-44 avec une activation de sa captation par inhibition de la synthèse couplée ou non à une alimentation exclusivement liquide par le soluté castase<sup>®</sup> (Nutrialys) carencé en polyamines et utilisé comme substitut nutritionnel chez les patients atteints de cancer.



Ce projet comporte deux protocoles ; nécessitant chacun 90 souris xénotransgéniques. Pour chaque protocole, les souris seront réparties en 8 lots de 7 à 10 souris par condition. Le nombre d'animaux a été choisi de manière à réduire au maximum leur nombre tout en s'assurant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. En effet, il est greffé plus d'animaux que nécessaire afin d'obtenir des groupes homogènes au niveau de la croissance tumorale avant le début du traitement, les expériences précédentes nous ayant montré une grande variabilité de prise tumorale selon les souris. Les animaux seront surveillés quotidiennement pour prévenir de toute souffrance éventuelle et mis à mort en cas d'atteinte des points limites.

555- L'objectif de ce projet est de déterminer les conséquences d'une sélection menée sur l'efficacité digestive chez le poulet de chair sur l'immunité innée, la composition du microbiote intestinal, la physiologie digestive et l'efficacité digestive, qui sont tous des caractères de robustesse de l'animal. L'amélioration de l'efficacité digestive est un enjeu important en termes économique et environnemental, qui devrait conduire à une réduction du coût de l'élevage par diminution du coût des aliments et à une réduction des rejets générés par les élevages. Nous souhaitons évaluer ses conséquences sur la robustesse de l'animal. Tous les processus physiologiques mesurés au cours de ce projet interagissent et sont régulés à l'échelle de l'animal, auquel on ne peut donc substituer un autre modèle expérimental.

Nous utiliserons en tout 440 poussins issus de croisements entre lignées sélectionnées à partir de la même souche de poulet de chair pour être soit bons soit mauvais digesteurs (D+/D-). Ces lignées présentent un intérêt scientifique unique car elles permettent d'étudier les conséquences physiologiques d'une sélection sur l'efficacité digestive. Lors de l'expérimentation principale, à partir de 400 poussins éclos, 200 du même sexe seront conservés afin d'éviter un effet lié au sexe déjà démontré sur la composition du microbiote intestinal. Puis 2 lots de 30 animaux seront constitués sur la base de leur efficacité digestive individuelle mesurée à deux semaines (faible vs forte). Le nombre d'animaux utilisés a été optimisé selon des contraintes statistiques et expérimentales. Différentes mesures physiologiques seront effectuées sur tous les animaux, à partir de prélèvements effectués juste avant (prises de sang) ou après (segments et contenus intestinaux) leur euthanasie à l'âge de 4 semaines. Une pré-expérimentation sera menée sur 40 animaux AIL D+/D- pour mettre au point les conditions de détermination de la composition en macromolécules de la fraction non bactérienne des contenus intestinaux et d'établissement des bilans digestifs. Cette quantité est nécessaire pour obtenir une gamme de variation proche de la variation de la population d'origine.

Les prélèvements effectués sur animaux vigiles pour mener à bien ce projet sont pas ou peu invasifs (prélèvement de fèces et prise de sang) et ne nécessitent donc pas de mise en place de moyens inhabituels pour réduire le stress et/ou la douleur. Les cages individuelles seront cependant enrichies par des jouets métalliques à picorer et par une ambiance sonore calme provenant d'une radio et alternant voix humaines et musique pendant les heures d'éclairage.

556- De nombreuses études ont été menées afin d'évaluer l'impact des techniques d'Assistance Médicale à la Procréation (AMP) sur la santé des enfants ainsi conçus. La notion de risque épigénétique a été évoquée, en raison du lien entre AMP et pathologies associées à des anomalies de l'empreinte parentale (syndromes de Beckwith-Wiedemann-BWS et de Silver-Russell-SRS). La reprogrammation épigénétique qui caractérise la période péri-conceptionnelle (gamétogénèse, fécondation et développement embryonnaire précoce) serait ainsi vulnérable aux manipulations mises en œuvre lors d'AMP. Cette reprogrammation est normalement essentielle pour la régulation de gènes développementaux clés, et les transitions entre pluripotence et différenciation de lignage. Elle est aussi fondamentale pour le contrôle des séquences répétées et en particulier des éléments transposables (Transposable Elements-TE). Les TE sont des séquences mobiles endogènes qui représentent plus de la moitié du génome chez la souris et l'homme, et qui peuvent altérer l'organisation et l'expression des gènes. Malgré leur présence en milliers de copies et leurs effets délétères potentiels, les études concernant leur rôle en reproduction sont quasi-inexistantes. Nous proposons que les TE pourraient représenter des senseurs et des acteurs de dérégulations épigénétiques liées à l'AMP. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets du protocole d'AMP le plus courant, la stimulation ovarienne et la fécondation in vitro (FIV), sur le contrôle des TE chez l'embryon préimplantatoire, en utilisant le modèle murin. Nous allons dans cet objectif utiliser le modèle murin wild-type de souche B6CBA/F1 que nous allons croiser avec des souris C57/Bl6 transgéniques Line1-Gf21 (Total 78-80 animaux).

557- Les laboratoires de recherche privés ou académiques comptent dans leur rangs de nombreux techniciens qui interviennent directement dans la mise en œuvre de projets scientifiques utilisant des animaux vivants. Ces

projets ont pour but d'améliorer à la fois nos connaissances mais aussi la santé humaine ou animale. Le DUT Génie biologique option analyses biologiques et biochimiques sanctionne la formation universitaire de techniciens supérieurs qui sont recrutés par les laboratoires. La formation porte en moyenne chaque année sur une 100 d'étudiants. L'objectif de ce projet est d'assurer les compétences des agents recrutés et de former au mieux les étudiants de première année sur la base de travaux pratiques (TP) chez le rat. Les TP seront réalisés sur l'animal anesthésié avec mise à mort avant réveil chez le rat (Sprague-Dawley mâle ou femelle) ou sur souris vigile (Swiss). Les étudiants seront formés à l'anatomie des systèmes, à la physiologie des fonctions ainsi qu'à l'analyse comportementale, en passant par l'apprentissage des techniques élémentaires d'administration, de prélèvement, de chirurgie. Le degré de gravité des procédures appliquées est soit sans réveil ou léger. Le nombre d'animaux pour mener à bien ces objectifs est estimé à 2695 sur 5 ans.

Du fait des requis pour la formation de techniciens, aucune méthode alternative nonanimale n'est ici adaptée. Sur la base de l'expérience des années passées et en conformité à la règle des 3R, le nombre des TP réalisés ainsi que le nombre d'animaux par TP sont limités à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs. Par rapport aux années précédentes, 3 TP d'anatomie effectués ont été fusionnés en 2TP avec 1 animal pour 2 étudiants (diminution de 150 rats). En résumé, par an et sachant qu'il y a 7 groupes de 14 étudiants, les TP nécessitent 441 rats : 49 animaux /TP (pour 5 TP avec 1 rat /2 étudiants) et 98 rats/TP (pour 2 TP avec 1 rat/étudiant) et 98 souris (1TP avec 1 souris / étudiant). Les espèces choisies sont celles qui sont les plus utilisées dans les travaux de recherches fondamentales ou appliquées. Tous nos animaux sont mis à mort par prolongation surdosée de l'administration systémique d'un anesthésique général.

558- La coccidiose est une maladie qui touche les élevages cynicoles. Selon l'espèce de coccidie en cause, elle peut être responsable de mortalités élevées, de fortes diarrhées, de simples chutes de croissance, voire même aucun signe clinique. Les coccidioses du lapin sont toutes dues à des coccidies du genre Eimeria, certaines espèces étant plus pathogènes que d'autres. Ce parasite se multiplie et se reproduit dans les cellules intestinales du lapin. Afin d'étudier des stratégies alimentaires, médicamenteuses ou naturelles pour lutter contre la coccidiose du lapin en élevage, il convient d'être capable de reproduire la maladie de façon expérimentale, c'est-à-dire de façon contrôlée et standardisée. Dans ce but, il est nécessaire d'être capable de produire un inoculum afin d'inoculer et reproduire la maladie chez des lapins.

Ce projet a pour but de développer une méthode de reproduction expérimentale de la coccidiose et de tester des solutions pour lutter contre la maladie. Il se découpe en deux phases : développement d'une méthode permettant la production d'un inoculum puis reproduction de la maladie afin de tester des solutions visant à diminuer ou empêcher la coccidiose. Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans et va concerner 1536 lapins.

559- Les leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B sont diagnostiquées chez environ 500 enfants par an en France. Parmi elles, la leucémie ETV6/RUNX1 est la plus fréquente et recouvre un groupe de bon pronostic avec 90% de survie à 10 ans, mais avec un risque de rechute à plus long terme, ce qui constitue un enjeu de santé publique.

Cette leucémie est une maladie humaine qui nécessite d'être étudiée au niveau physiologique. Nous utilisons comme modèle d'étude la souris.

Pour cela, nous injectons des cellules de leucémies humaines qui auront été modifiées génétiquement pour déréguler des protéines liées à la dissémination des cellules (CD9, RAC1 et leurs partenaires).

Le projet porte sur :

- le suivi de la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme après injection dans des souris
- la modulation de cette dissémination par des anticorps, et des molécules utilisées en thérapie de l'enfant.
- le suivi de l'apparition de cancers (leucémies) et courbes de survie.

Dix souris par groupe seront utilisées pour ces expériences. Nous estimons le nombre d'animaux requis à 344 souris sur 5 ans.

En conclusion, ces expériences menées sur des souris ont pour objectif de récapituler in vivo les processus moléculaires impliqués dans l'initiation, la progression ou les rechutes tumorales.

560- Le stress est un des facteurs susceptibles de précipiter l'émergence de maladies psychiatriques. Les études post-mortem et de neuroimagerie révèlent que la plupart des régions cérébrales affectées par la dépression sont également impliquées dans la réponse au stress. L'exposition au stress se traduit dans certaines situations, par une atrophie neuronale, une diminution de la neurogenèse et une forte perturbation de la plasticité synaptique. L'originalité de nos travaux a été de démontrer récemment que les effets négatifs du stress s'étendent à la

plasticité des régions cortico-limbiques. Nous avons montré que l'exposition du rat à un stress aigu ou chronique produit des changements durables de plasticité synaptique et si le stress se répète, on observe des modifications structurales au niveau cortical et des déficits de mémoire. Le résultat majeur de ces travaux est d'avoir montré la réversibilité partielle ou complète des effets délétères du stress avec l'administration de certains psychotropes. Nous avons validé ce modèle et poursuivons cette approche intégrative chez le rat (1) au niveau cellulaire et moléculaire : nous explorons les mécanismes qui sous-tendent les effets délétères du stress en prenant en compte l'hétérogénéité des régions impliquées (2) au niveau des circuits neuronaux : nous étudions la plasticité des réseaux cortico-limbiques dans de nouveaux modèles pharmacologiques et dans un modèle d'inflammation. Nous prévoyons d'utiliser 480 rats sur 5 ans. Un tel effectif est nécessaire afin de parer aux inévitables erreurs expérimentales et de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes.

561- Le paludisme est une maladie infectieuse due à un parasite du genre Plasmodium, propagée par la piqûre de certaines espèces de moustiques comme les Anophèles. 219 millions de cas de paludisme sont observés sur l'année 2010, avec une marge d'incertitude de plus ou moins 70 millions de cas. Cette pathologie cause 660 000 décès par an. Le développement de nouvelles molécules contre le paludisme est donc indispensable et urgent dans le contexte de l'extension rapide de résistances multiples contre les médicaments actuels. Ce développement passe par la réalisation de tests in vitro en première ligne, puis de tests d'efficacité chez la souris. Cette procédure est internationalement acceptée par tous les auteurs, et sous les auspices du consortium international de la malaria, unique pipeline (gestion et conduite destinées à l'acheminement des médicaments) de l'industrie pharmaceutique pour les médicaments contre le paludisme. Le consortium prend dans son pipeline des molécules qui ont démontré leur efficacité in vitro et chez la souris, et qui ont fait la preuve de leur non-cytotoxicité in vitro.

Depuis plus de 10 ans, nous développons des recherches pour la mise au point de nouvelles molécules anti-paludiques, présentant des mécanismes d'action originaux et non sensibles aux mécanismes connus de résistance du parasite. Nous disposons désormais de molécules candidates très efficaces et non cytotoxiques in vitro, et il est maintenant indispensable de les tester chez la souris. Ce projet composé de plusieurs expérimentations nécessitera un total de

265 souris. Là où les molécules les plus actives seront prises dans le Pipeline. Ce pipeline permettra le financement des recherches de phase I, II, et III chez l'homme, afin de mettre à disposition des millions de patients souffrant de paludisme chaque année, une molécule efficace, peu coûteuse et pérenne.

562- Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture et le déplacement grâce à leurs propriétés contractiles. Ils jouent également un rôle métabolique important. La régénération tissulaire est essentielle pour retrouver toutes les fonctions de l'organe après un traumatisme. Le muscle adulte de vertébrés possède une capacité remarquable de régénération, et ce après la destruction du muscle. La régénération des fibres dépend des cellules satellites qui sont les cellules souches musculaires. Pour pouvoir régénérer un muscle de taille normale, ces cellules doivent proliférer, se différencier en cellules musculaires et fusionner entre elles pour former des myotubes ou se fusionner aux myotubes existants. Les mécanismes régulant la balance entre prolifération et différenciation des cellules souches nécessaires à la régénération sont encore mal caractérisés.

La médecine régénérative a fait de nombreux progrès grâce à l'étude des mécanismes responsables du développement et de la régénération musculaire. Néanmoins, une meilleure compréhension des processus impliqués dans la régénération fibrillaire est nécessaire notamment pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires précis. Cela va également permettre des avancées sur les études consacrées aux thérapies des maladies musculaires et/ou aux traumatismes musculaires sévères.

Le projet consiste à appliquer un modèle de régénération musculaire chez des souris génétiquement modifiées afin d'étudier l'implication de nos protéines d'intérêts dans les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la dégénération et/ou la régénération fibrillaire.

563- Le laboratoire, qui est un centre national de référence, a développé une thématique importante de découverte de nouveaux agents pathogènes en particulier les bactéries intracellulaires dont la culture est difficile et souvent infructueuse puisque des milieux spécifiques n'ont pas pu être mis au point. Le laboratoire reçoit plusieurs milliers de prélèvements (sang, biopsies, LCR, arthropodes, insectes...) effectués par des vétérinaires ou des médecins dans le cadre de consultations ou de projets de recherches. Certains de ces prélèvements

contiennent des micro-organismes en petite quantité qui n'ont jamais été décrits ou dont la culture n'a jamais été mise au point, d'où l'intérêt d'amplifier les pathogènes en les inoculant à un animal de laboratoire sensible. A partir des prélèvements de l'animal infecté il sera possible d'ensemencer une gamme variée de milieu afin d'identifier et de mettre au point une culture axénique. Moins d'une cinquantaine de prélèvements seront concernés par cette procédure, donc moins de cinquante animaux seront utilisés annuellement.

564- La vaccination des porcelets contre l'infection par le Circovirus porcine de type 2 (PCV2) a pour objectif de réduire l'excrétion fécale de virus et la charge virale dans le sang et donc de contribuer à diminuer les signes cliniques liés au PCV2 (amaigrissement, perte de poids et mortalité), ainsi que de réduire la charge virale et les lésions des tissus lymphoïdes associées à l'infection.

Cette étude se propose donc d'évaluer les effets de la vaccination des porcelets sur la santé et les performances de croissance des porcelets du sevrage à l'abattage dans les conditions d'élevages similaires à celles rencontrées dans les élevages de production française. Elle s'appuie sur des observations cliniques des animaux, des notations des lésions à l'abattoir et des indicateurs zootechniques (poids, aliments consommés) sur 84 animaux vaccinés et 84 animaux témoins, élevés dans des conditions d'élevages respectant les normes de bien-être pour les animaux d'élevage (surface disponible par animal, type de sol, présence de matériaux d'enrichissements, etc...). Cette étude permettra en particulier de mesurer les consommations individuelles d'aliment par les animaux et donc de calculer les indices individuels d'efficacité alimentaire et de les mettre en relation avec le statut vacciné (la vaccination vis-à-vis du PCV2 se fait avec un vaccin ayant une Autorisation de Mise sur le Marché pour l'indication de circulation et expression clinique du PCV2 sur les porcs en croissance et fait partie de la pratique vétérinaire autorisée) ou non de l'animal et l'expression clinique éventuelle du PCV2, ces indices n'ayant pas jusqu'à présent été investigués dans un contexte d'élevage de circulation du PCV2 et d'expression clinique de la maladie. Le choix de travailler sur des couples de porcelets issus de la même mère permet de prendre en compte la variabilité individuelle de l'immunité colostrale liée à l'immunité maternelle et donc de limiter le nombre d'animaux inclus dans l'essai. Le suivi sérologique permet de vérifier la circulation virale du PCV2 et nécessite un nombre de 10 porcs minimum en fin de période d'engraissement (ce diagnostic sérologique fait également partie de la pratique vétérinaire autorisée et courante)

565- L'objectif de ce travail est donc de tester si, par une supplémentation nutritionnelle en protéines de différentes qualités au cours de la phase de récupération à la suite de l'immobilisation chez les individus âgés, il est possible de favoriser la récupération de muscle aussi bien en termes de masse que de fonctionnalité. Le modèle d'immobilisation choisi est le plâtrage unilatéral d'un membre inférieur chez le rat car il présente l'avantage d'être réversible (récupération possible lorsque le plâtre est ôté).

Le vieillissement normal non pathologique est associé à une perte progressive et lente de la masse et de la force musculaire, un phénomène connu sous le terme de sarcopénie. Aujourd'hui il a été bien démontré qu'au cours du vieillissement, le muscle squelettique ne répond plus aux stimuli anaboliques comme la prise alimentaire et une perte des capacités de récupération de la masse musculaire après un état catabolique aiguë a aussi été démontrée. De ce fait, la succession de périodes cataboliques suivies de récupération incomplètes va forcément résulter en une perte significative de la masse musculaire au cours de la vie et ce phénomène a été appelé récemment "the catabolic crisis model". Au-delà des états cataboliques aigus, les périodes d'inactivité physique qui augmentent avec l'âge peuvent également rentrer dans ce schéma. Dans ce cadre, nous avons montré que contrairement aux adultes, la masse musculaire perdue après un plâtrage unilatéral d'un membre inférieur n'était pas récupérée avec le vieillissement.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez l'animal âgé (n=126) afin de caractériser les effets de sources protéiques optimisées sur la récupération de la masse musculaire post plâtrage mais aussi sur les performances musculaire en termes de force, puissance et fatigabilité. L'immobilisation est une condition physiologique impossible à reproduire sur des modèles expérimentaux plus simples comme la culture de tissus ou de cellules.

D'autre part, l'immobilisation chez la personne âgée est retrouvée lors d'évènements pathologiques (maladie, fractures, ...) ou de grande fatigue ce qui rend éthiquement difficile ce type d'expérimentation chez la population ciblée dans le projet. In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de certaines sources protéiques dans le maintien et la récupération musculaire des personnes âgées.

566- Les poux sont des ectoparasites obligatoires des mammifères et d'oiseaux avec plus de 3000 espèces décrites. Les poux qui parasitent l'homme appartiennent à deux familles dont les membres sont strictement hématophages, on distingue ainsi le pou de tête, le pou de corps et le pou pubien. Les poux de corps nichent dans les replis et les coutures des vêtements. Le pou de corps cause des nuisances par ses piqûres (pédiculose corporelle) mais il est aussi connu comme vecteur de pathogènes responsables de maladies infectieuses (typhus épidémique, la fièvre des tranchées et la fièvre récurrente à poux).

L'objectif de ce projet est d'utiliser les lapins pour maintenir l'élevage des poux humains. Ces poux proviennent d'une même souche (Floride) exempte d'agents pathogènes. La présence de pathogènes dans ces poux et les lapins nourris est vérifiée régulièrement dans notre laboratoire. Cet élevage de poux a de nombreuses utilités : test de résistance aux insecticides, étude génétique de l'origine des poux ainsi que leur diversité, enseignement (CESU entomologie médicale), test des effets des antibiotiques sur leur survie. Ils sont également utilisés pour étudier leur rôle comme vecteur de certaines bactéries comme les Rickettsies, Bartonella, Yersinia... Ils font partie aussi de notre « collection » d'insectes mis à disposition de tout chercheurs ou étudiants ayant un projet de recherche sur ces insectes. Cet élevage à plusieurs années et sa mise en place est longue et fastidieuse avant d'arriver au degré de maîtrise que nous avons actuellement.

Le lapin blanc (New Zeland) est anesthésié pendant heure, le ventre est rasé puis désinfecté à l'alcool chirurgical. Les poux sont disposés sur le ventre du lapin. Une fois la manipulation terminée, le lapin est replacé dans sa cage. Les poux sont nourris 3 fois par semaine. Quatre lapins sont utilisés en alternance et ils sont conservés pendant une année. 20 Lapins seront nécessaires pour ce projet.

567- Les maladies cardio-vasculaires et neuro-vasculaires les plus fréquemment responsables du décès chez l'homme sont le choc septique (CS), l'infarctus du myocarde (IDM), et l'accident vasculaire cérébral (AVC). Bien qu'engendrant des lésions organiques différentes, ces 3 types de pathologies se caractérisent par un certain nombre de processus physiopathologiques communs. En particulier, le caractère inflammatoire de ces maladies est largement démontré.

Un des acteurs essentiels au développement de cette réponse inflammatoire est le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1). TREM-1 est une protéine présente à la surface des globules blancs et qui joue un rôle important dans l'amplification de la réponse inflammatoire. Un peptide mis au point au laboratoire (LR12) possède la propriété de moduler l'activation de TREM-1 et ainsi de réduire la réponse inflammatoire. Nous nous proposons donc ici d'étudier l'effet de ce peptide au cours des 3 pathologies suivantes :

Le choc septique représente la forme la plus explosive de la réponse inflammatoire qui résulte de l'invasion de l'organisme par un agent infectieux. Il en résulte une hypotension artérielle persistante malgré un remplissage vasculaire.

L'objectif de cette première partie est de mettre en évidence le rôle de TREM-1 au cours du sepsis expérimental et les conséquences de sa modulation. Nous utiliserons différentes approches expérimentales complémentaires : 36 souris et 36 rats seront nécessaires.

L'infarctus du myocarde est la conséquence d'une ischémie cardiaque qui lorsqu'elle est irréversible se traduit par une mort du muscle cardiaque, contribuant à la genèse de l'insuffisance cardiaque. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence le rôle de TREM-1 au cours de l'infarctus du myocarde et les conséquences de sa modulation. 126 souris et 72 rats seront nécessaires.

L'accident vasculaire cérébral existe sous deux formes : hémorragique (20%) et ischémique (80%). L'inflammation est un processus majeur après un AVC ischémique. Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence le rôle de TREM-1 au cours de l'AVC ischémique et les conséquences de sa modulation. 240 rats seront nécessaires.

Nos études préliminaires, essentiellement au cours du choc septique, nous ont permis de montrer que la modulation de TREM1 par le peptide LR12 améliore la santé de l'animal : nous souhaitons donc démontrer ce même résultat dans le cadre de l'IDM et de l'AVC, et préciser les mécanismes d'action de ce peptide.

568- L'insuffisance veineuse chronique (IVC) est un problème de santé publique significatif, les estimations indiquent que 2-5% de la population ont des modifications de leurs modes de vie liées à l'IVC. Des veines variqueuses exigent un traitement pour 10-15% de la population, autour de 2% de la population présentent des atteintes cutanées, et les ulcères veineux affectent environ 1% de la population.

Nous voulons créer un modèle d'insuffisance veineuse fiable et valide qui reproduit la symptomatologie clinique d'un patient malade afin de pouvoir tester de nouvelles thérapeutiques.

Il s'agit d'un modèle d'anastomose artérioveineuse termino-latérale ou latéro-latérale sur un modèle de rat de l'artère fémorale sur la veine fémorale. Le but étant de recréer l'hypertension veineuse responsable de la symptomatologie clinique. Deux souches de rats seront testées : Wistar Han (n=10) et Sprague-Dawley (n=10). L'appréciation de l'efficacité se fera par des mesures non invasives (échographie) et invasive (Pression tissulaire en Oxygène : PtiO<sub>2</sub>).

D'autres investigations seront réalisées grâce aux examens cliniques (mesure de l'œdème) et des études biologiques post-mortem.

569- Le développement de nouveaux outils thérapeutiques nécessite une bonne connaissance des signalisations impliquées dans la pathologie. Afin de décrypter les signalisations impliquées dans les résorptions osseuses pathologiques, en particulier celles associées au développement des tumeurs osseuses, le recours aux souris transgéniques invalidées pour certains gènes et/ou surexprimant d'autres gènes est nécessaire. L'élevage de souris transgéniques de classe I (dossier de déclaration d'utilisation confinée d'organismes génétiquement déposé au MESR) sera réalisé dans une pièce dédiée de l'animalerie en armoires ventilées afin de fournir le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation des protocoles de notre unité ayant reçu un avis favorable du comité d'éthique. Un nombre de 20 souris mutantes homozygotes sera nécessaire par année et par lignée pour des raisons de significativité des études statistiques des protocoles qui seront développés avec ces mutants. L'obtention de ces 20 mutants nécessite un nombre plus important d'animaux transgéniques (hétérozygote) qui avoisinera les 100 souris/an en se basant sur la loi de Mendel, soit pour 10 lignées sur 5 ans un total de 5000 souris. Une analyse rétrospective des portées obtenues (nombre d'animaux hétérozygotes versus homozygotes, ...) sera faite tous les ans afin de voir si chaque lignée suit la loi de Mendel. Dans le cas contraire, une augmentation du nombre de croisement pourra être entreprise pour maintenir la lignée. Dans tous les cas, les animaux seront produits à la demande des expérimentateurs afin d'éviter toute euthanasie inutile d'animaux surnuméraires.

570- Ce projet a pour objectif principal d'étudier le devenir d'une molécule, candidat-médicament, chez le mini-porc lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Pour cela, des prélèvements sanguins répétés sont réalisés chez le mini-porc vigile après l'administration du candidat-médicament et éventuellement du véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée (en général 4 groupes de 3 animaux par groupe ; soit un nombre prévisionnel maximum de 60 animaux sur 5 ans). Ces prélèvements de sang sont utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents. Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 24 heures de récupération entre 2 administrations.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le mini-porc car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Le mini-porc présente de nombreuses similitudes physiologiques et anatomiques avec l'homme. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études pharmacocinétiques sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part (souris, rat, cobaye) et les gros mammifères d'autre part (mini-porc, lapin, chien, primate non-humain). Un nombre minimal et homogène d'animaux par étude est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

571- La reconstruction d'une perte osseuse d'un défaut de taille critique reste un challenge.

La technique chirurgicale de la membrane induite pour des pertes de substance osseuse a été initialement proposée pour les grandes pertes de substance osseuse. Les chirurgiens ont montré que la technique de la membrane induite décrite pour la reconstruction des os longs avec greffe d'os autologue pouvait être adaptée à la reconstruction mandibulaire et pour la reconstruction des défauts de taille critique du métatarse chez la brebis. Les grands avantages de la réparation osseuse dans une membrane induite sont 1) que la membrane amène la vascularisation dans un site peu vascularisé et 2) que la membrane isole le comblement contre le reste du corps

permettant d'avoir une réaction inflammatoire modérée en comparaison avec la réaction inflammatoire à un comblement classique.

Cette technique se réalise en deux étapes : premièrement, une entretoise de ciment est d'abord mise en place dans la perte de substance osseuse pour induire la formation d'une membrane pseudo synoviale, comme réaction à un corps étranger. Un des inconvénients de cette méthode est que le tissu s'accroche sur le ciment et qu'on risque de perdre une partie de la membrane pendant l'ablation du conformateur.

Cette membrane peut, dans une seconde étape après l'ablation du conformateur, être comblée avec un biomatériau qui favorise la reconstruction osseuse. Il était montré que l'os autologue pouvait être substitué par une céramique phosphocalcique à condition que le facteur de croissance « Bone Morphogenetic Protein-2 » (BMP-2) soit apporté. Ce facteur de croissance est cependant très onéreux et est contre-indiqué en contexte carcinologique.

Plusieurs études ont montré que les statines augmentaient l'expression de la BMP2 par les ostéoblastes, conduisant à une augmentation de la formation de l'os et améliorerait la vascularisation.

Le but de ce projet scientifique est de tester la pertinence de la protéine « Bone morphogenetic Protein 2 » (BMP-2) en comparaison avec la statine Simvastatine en association avec un biomatériau déjà commercialisé et la moelle osseuse dans une membrane induite provoquée par un conformateur en polymère lisse dans un défaut de taille critique en site osseux.

L'étude sera réalisée avec 48 rats Wistar Han pour effectuer des défauts segmentaires fémoraux avec la mise en place des membranes induites qui seront comblées avec un biomatériau commercialisé associé ou non à la moelle osseuse prélevée ou à la BMP-2.

572- Ce projet concerne l'optimisation ou la mise sous contrôle de procédés ou le développement de nouvelles formulations d'un produit immunologique destiné à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle chez cette espèce.

La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale répétitive permettant d'évaluer l'efficacité de ce produit en fonction des paramètres modifiés ainsi qu'une procédure de validation de l'outil permettant cette évaluation.

Ces procédures sont conçues en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment: un caractère de stricte nécessité et ne pouvant pas être remplacées par des méthodes expérimentales alternatives : en effet, elles répondent à l'obligation réglementaire d'être conduites sur l'espèce de destination et à l'âge minimum préconisé pour chaque procédure,

- un nombre d'animaux utilisés réduit à son minimum car chaque fois que cela sera possible, un seul groupe témoin commun sera utilisé en même temps que plusieurs groupes vaccinés. De plus, le nombre d'animaux envisagé par groupe sera le nombre minimum requis par la réglementation. Au total, un nombre maximum de 76 animaux sera impliqué dans ce projet,
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures,
- du fait de la classe sévère des procédures, des points limites adaptés et précisément définis qui seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux,
- un hébergement des animaux par groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement

573- L'objectif de ce projet est de mesurer de façon la plus précise possible les nutriments digérés et/ou métabolisés par l'animal et ceux rejetés dans les fientes. Cela permet de faire un « bilan » c'est-à-dire, quantifier le pourcentage de chaque nutriment réellement disponible (par la mesure de sa digestibilité) pour l'entretien, la croissance ou la production de l'animal ou à l'inverse, excrété dans l'environnement. Mesurer de manière précise la digestibilité des aliments, qui peut être variable, permet de les adapter au mieux aux besoins des animaux et de réduire les rejets dans l'environnement.

Seule l'évaluation sur animaux permet de mesurer avec précision la valeur nutritionnelle et le niveau de rejets d'un aliment et le coq est un modèle utilisé classiquement pour cela. Les valeurs obtenues sur coqs permettent d'estimer la valeur nutritionnelle chez les animaux en croissance et la poule pondeuse, tout de moins de manière comparative. Son adaptation facile à l'environnement expérimentale et l'homogénéité de réponse entre individus, permet de générer un grand nombre de données avec un nombre réduit d'animaux.

Pour ce projet, 64 coqs adultes permettent la réalisation des bilans digestifs pendant 4 ans (32 coqs tous les deux ans). Ils sont élevés dans une salle équipée de cages individuelles, nourris et abreuvés à volonté.

Les données ainsi obtenus permettent de générer des bases de données, modèles ou équations qui réduisent in fine l'utilisation des animaux.

574- Chez la plupart des espèces, un certain nombre de réflexes assurent le maintien de l'équilibre et la stabilisation du regard (œil et tête) dans l'espace, lors des déplacements. La stabilisation du regard est fondamentale car elle permet de stabiliser l'image du monde visuel sur la rétine lorsque l'animal (ou le sujet) se déplace.

Le réflexe optocinétique, d'origine visuelle, est déclenché par le glissement de l'image sur la rétine. Il se traduit par un mouvement des yeux (et/ou de la tête) qui vont alors suivre le défilement du décor visuel de manière à stabiliser l'image rétinienne. Chez les oiseaux en conditions naturelles, ce réflexe est essentiellement assuré par les mouvements de la tête. Nous travaillons depuis plusieurs années sur ce réflexe. Nous avons ainsi montré (avec d'autres auteurs), que chez le pigeon les performances de la réponse optocinétique dépendent de la situation comportementale. En effet, ce réflexe est nettement plus performant, c'est-à-dire plus rapide, lorsque l'animal est en situation de vol que lorsqu'il est 'au repos'.

Dans les conditions naturelles, d'autres réponses motrices se combinent au réflexe optocinétique. Par exemple, durant le vol, les mouvements du corps et de la tête déclenchent des réponses motrices qui vont se combiner au réflexe optocinétique. On sait en particulier que les mouvements de la tête déclenchent des réponses réflexes (d'origine proprioceptive) au niveau des yeux et de la nuque.

Nous nous proposons donc d'étudier les interactions entre l'entrée visuelle, qui déclenche la réponse optocinétique, et les entrées proprioceptives nucales (liées aux mouvements de la tête), afin d'estimer leurs conséquences sur la stabilisation du regard (œil et tête). Plus précisément, l'objectif est de comparer ces interactions chez le pigeon 'au repos' et durant le vol. En effet, compte tenu de l'augmentation de l'efficacité de la réponse optocinétique lorsque l'animal est en vol, il est probable que les réponses oculaires et nucales issues des interactions visuo-proprioceptives soient également influencées par cette situation comportementale. Nous comptons effectuer ces expériences comportementales sur 25 animaux, nombre minimum requis compte tenu des variations interindividuelles que nous avons observées lors des études précédentes. Les animaux feront l'objet d'un traitement analgésique post-opératoire ainsi que de soins individualisés afin d'assurer une récupération rapide et complète. Les tests comportementaux ne sont pas invasifs.

Ces expériences s'inscrivent dans la continuité des travaux que nous avons effectués précédemment et dont le but est, d'une part de mieux comprendre l'influence de la situation comportementale sur des réflexes qui sont en général étudiés dans des conditions expérimentales artificielles (animaux contraints), et d'autre part de mesurer les effets des interactions qui se produisent naturellement entre plusieurs réflexes, alors que ceux-ci sont souvent étudiés isolément.

575- Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) demeurent un véritable fléau en étant la première cause de handicap acquis chez l'adulte et la deuxième cause de mortalité. La reperfusion est le moyen le plus puissant connu jusqu'à présent pour réduire la taille de la lésion ischémique. Cependant, des lésions apparaissent spécifiquement lors de la reperfusion. La réduction de ces lésions représente donc un objectif thérapeutique majeur.

Cependant, l'évaluation de l'efficacité de nouvelles thérapies neuroprotectrices impose l'utilisation de modèles expérimentaux d'infarctus cérébral fiable et reproductible dont les résultats pourront être extrapolables à l'homme. A l'heure actuelle, le modèle le plus couramment utilisé est celui d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne à l'aide d'un mono-filament inséré par la carotide externe exposé chirurgicalement. Ce modèle présente néanmoins un certain nombre de limites (chirurgie cervicale invasive, reperfusion précoce, hémorragie cérébrale). Un nouveau modèle vient très récemment d'être décrit et semble être plus reproductible et nettement moins invasif.

L'IRM représente une modalité d'imagerie idéale pour la recherche translationnelle dans l'ischémie cérébrale. L'IRM multimodale peut fournir des informations sur l'importance et la sévérité de l'ischémie (diffusion), l'hémodynamique cérébrale (perfusion), et sur l'état de perméabilité de l'artère (angio-IRM). Le but de ce travail est de caractériser par IRM ce nouveau modèle d'infarctus cérébral transitoire afin d'évaluer sa pertinence dans le cadre de l'ischémie-reperfusion cérébrale

Le pronostic clinique est directement lié à la rapidité et l'efficacité de la recanalisation artérielle. Cependant, la reperfusion elle-même est à l'origine d'une majoration des lésions tissulaires. Il a été démontré chez l'animal puis chez l'homme que le post-conditionnement mécanique (séries de brèves occlusions vasculaires lors de la reperfusion) diminue de 40% la taille finale de l'infarctus après ischémie myocardique. Dans le cadre de l'ischémie



cérébrale, le rôle neuroprotecteur du post-conditionnement a été peu étudié et les résultats sont contradictoires. Le deuxième objectif de ce travail est d'étudier l'impact du post-conditionnement mécanique dans ce nouveau modèle d'ischémie cérébrale focale réversible chez le rat. Le nombre d'animaux envisagé est de 60, 20 pour la caractérisation IRM et 40 pour l'évaluation du post-conditionnement.

576- Le SIDA est une maladie infectieuse due au virus de l'immunodéficience acquise (VIH). On considère qu'environ 34 millions de personnes sont infectées. Il n'existe, à ce jour aucun, traitement (les traitements actuels ralentissent l'évolution de la maladie sans éradiquer complètement le virus) ou vaccin. Une meilleure connaissance des infections par le VIH et le SIV demeure nécessaire pour développer de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Un certain nombre de patients infectés par le VIH et certains macaques infectés par le SIVmac (virus infectant le macaque de façon similaire au VIH chez l'Homme) sont capables de maintenir un contrôle efficace de l'infection à long terme, en absence de tout traitement. Le but des nouvelles thérapies et futurs vaccins est d'obtenir un contrôle similaire à celui observé chez ces sujets. Par ailleurs l'activation chronique du système immunitaire résiduelle chez ces patients favorise l'émergence de pathologies.

L'objectif de ce projet d'étude sera d'analyser la cinétique et la qualité des réponses innées et adaptatives au cours du contrôle de l'infection, avec une attention particulière pendant la primo-infection et la phase de transition vers l'infection chronique, dans un contexte génétique favorable ou non. L'activation chronique du système immunitaire sera mesurée.

Le projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il permettra, à terme, de valider des modèles de non-progression à long terme permettant d'évaluer des stratégies immuno-thérapeutiques ayant pour objectif d'éradiquer l'infection virale, de réduire l'inflammation résiduelle observée chez les patients à charge virale contrôlée, et de guider le développement d'un vaccin efficace.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont des macaques *Cynomolgus* nés et élevés en captivité. Leur nombre de 18 a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour assurer une analyse statistique comparative de 3 groupes de 6 macaques présentant un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) différent ou infectés par une dose de virus différente. Le modèle primate se justifie par la possibilité de réaliser une étude longitudinale avec accès aux phases très précoces de l'infection, souvent inaccessible chez l'homme car le diagnostic de l'infection est plus tardif, et par le fait que ce modèle est reconnu comme reproduisant la pathogénèse observée chez l'homme infecté par le VIH. Par ailleurs, l'utilisation d'une espèce proche de l'homme permet de bénéficier des outils immunologiques communs permettant de disposer d'évidences immunologiques associées au contrôle de l'infection virale et donc de faciliter la transposition des données de l'étude à l'homme et d'accélérer le développement de stratégies thérapeutiques pouvant résulter de cette recherche.

Le projet dans sa globalité est classé au degré de sévérité modéré, tous les prélèvements sanguins et biopsies étant réalisés sous anesthésie, à l'aide de méthodes peu invasives. Les protocoles d'anesthésie pour les prélèvements ont été définis et validés par une équipe vétérinaire.

Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

577- La Dengue est une maladie virale causée par un arbovirus et transmise par l'intermédiaire d'un vecteur, le moustique (Aèdes). L'OMS considère qu'environ 40 millions de personnes sont potentiellement exposées à ce virus dans le monde. Dans 2,5% des cas, cette infection conduit à une forme hémorragique potentiellement mortelle chez l'Homme. Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique et aucun vaccin efficace permettant de se protéger de cette maladie.

L'objectif de ce projet est de sélectionner des « candidats vaccins » qui pourraient avoir des applications cliniques chez l'Homme à moyen terme. Il comprend plusieurs étapes : la mise au point expérimentale (choix de la souche de virus permettant de reproduire expérimentalement l'infection, choix de la voie d'inoculation du virus) puis un essai de protection par différents candidats vaccins sur le modèle d'infection mis au point lors de la première étape.

Les essais de protection par des vaccins ne peuvent être réalisés que sur des organismes entiers ; le modèle animal est nécessaire pour apporter le maximum d'informations avant la réalisation d'essais chez l'Homme. Actuellement, il est impossible de ne pas recourir à des modèles animaux. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate afin d'avoir d'une part une réponse vaccinale similaire à celle qui sera obtenue chez l'Homme et d'autre part un modèle d'infection par le virus de la Dengue comparable à la maladie humaine.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements sous anesthésie...). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de limiter la durée de l'infection (60 jours après infection) et de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination), le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

578- Les maladies cardiaques ischémiques ou dégénératives sont une cause importante de morbidité et de mortalité chez l'Homme. La médecine réparatrice est une nouvelle approche pour le traitement de ces pathologies susceptibles d'améliorer la guérison des personnes atteintes. Dans le domaine de l'insuffisance cardiaque, différents types de cellules issus de tissu adulte ont été testés ou sont en cours d'évaluation pour remplacer les cardiomyocytes lésés mais les résultats demeurent encore modestes.

Les cellules souches embryonnaires (ES) constituent une source théoriquement illimitée de différents types cellulaires. Les cellules hES sont aujourd'hui en phase d'études cliniques dans quelques équipes

Le but de ce projet est d'évaluer la faisabilité, l'intérêt et la sécurité de l'administration de macrophages issus de cellules embryonnaires et leur capacité à participer à la réparation cardiaque dans un modèle d'infarctus aigu du myocarde chez le primate non humain. La réparation du muscle cardiaque sera évaluée par des technologies non invasives d'imagerie IRM et TEP, complétée par de l'histopathologie.

Le projet utilise 3 modèles primate non humains nés et élevés en Europe. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'amélioration de la cicatrisation grâce à la greffe en comparaison avec les indicateurs de cicatrisation classiquement observés en pratique hospitalière.

Le modèle primate se justifie par la possibilité de disposer de cellules ES de primates (il n'existe pas de cellules ES dérivées à partir d'autres grands animaux) et de réaliser une étude préclinique dans des conditions très proches des futures applications cliniques. Nous savons produire des macrophages embryonnaires à partir de cellules pES de primates et nous disposons d'un modèle d'infarctus du myocarde par ligature chirurgicale de l'artère circumflexe chez le primate.

Si les résultats de cette étude mettent en évidence une amélioration de la cicatrisation de l'infarctus, des études complémentaires seront nécessaires pour affiner le protocole.

Ce modèle développé dans une démarche translationnelle permettra à terme de développer un protocole de thérapie préclinique pour soigner les infarctus du myocarde.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie pour la chirurgie thoracique (induction de l'infarctus et injection des cellules pour la greffe), ont été définis par un chirurgien cardiologue et un vétérinaire en se basant sur les pratiques efficaces utilisées chez l'Homme dans les services de cardiologie. La thérapie anti arythmique et anti thrombotique préventive et le dispositif de suivi de l'animal permettent de contrôler les éventuelles douleurs et de limiter les contraintes. Les examens d'imagerie sont non invasifs et permettent d'obtenir des informations sur la taille de l'infarctus, sa vascularisation et sa fonctionnalité sans nécessiter d'interventions susceptibles d'entraîner des douleurs.

Les interventions sur les animaux sont classées au degré de sévérité modérée. Le projet a été soumis au comité d'éthique et l'ensemble de ses recommandations seront mises en œuvre.

579- Les polyomavirus, du fait de la démonstration de leurs propriétés oncogéniques chez l'animal, ont longtemps été suspectés d'être impliqués dans la carcinogénèse chez l'Homme.

Cependant, les études menées depuis une quarantaine d'années n'ont pas fourni de preuves convaincantes d'une association avec des cancers humains.

En 2008, un nouveau membre de cette famille, le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV), a été isolé dans des carcinomes à cellules de Merkel, un cancer cutané rare mais agressif. Ce carcinome cutané est décrit comme indolore par les cliniciens. A la suite de cette découverte, il a été montré que l'infection par le MCPyV est très répandue dans la population et que seule une faible proportion des infections MCPyV évolue vers un carcinome à cellules de Merkel (CCM). Le MCPyV a été reconnu en 2012 comme agent cancérigène 2A par l'IARC/OMS. Le MCPyV est un virus à ADN double brin, non enveloppé appartenant au genre orthopolyomavirus. Son génome d'environ 5,4 kb est divisé en régions précoces et tardives séparées par une région promotrice. La région précoce code les oncogènes viraux Ag-LT et Ag-sT et la région tardive code les protéines de capsid (VP-1, -2, -3).

Il n'existe à l'heure actuelle pas de modèle animal pertinent pour étudier in vivo le CCM et évaluer des thérapies vaccinales thérapeutiques.

Ainsi, des cellules primaires de rein de souris C57BL6 ont été établies et transduites avec des vecteurs rétroviraux codant l'Ag LT et la totalité de la région précoce (LT + sT). Le caractère transformé des cellules a été évalué par des tests clonogéniques en soft-agar. Des foyers de cellules ont été isolés.

La première étape in vivo est d'évaluer la tumorigénicité in vivo de ces deux lignées en les injectant selon deux voies (sc et ip). Cette phase du projet mettra en jeu 25 souris (5 par voie d'injection des deux types cellulaires (LT et LT+sT) ainsi que 5 souris témoins de croissance pondérale.

La seconde phase, dépendant du succès de la première, consistera à vérifier la reproductibilité de la tumorigénicité et mettra en œuvre 15 animaux qui recevront le lot de cellules retenu suite à la première étape. Le projet nécessite l'utilisation de 40 souris.

580- L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la troisième cause de mortalité et la première cause de handicap acquis de l'adulte dans les pays industrialisés. Le seul traitement actuellement homologué est le traitement thrombolytique intraveineux par l'activateur tissulaire du plasminogène. Il est donc crucial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter ces patients. Des essais précliniques d'un inhibiteur de CDK5, ont récemment démontrés un effet neuroprotecteur dans des modèles in vitro et in vivo d'ischémies cérébrales. Notre projet s'inscrit dans cette continuité et vise à valider l'efficacité à long terme de cette molécule dans un modèle animal d'accident vasculaire cérébrale. Actuellement, nous rencontrons des problèmes de libération continue de la molécule en raison d'une solubilité relativement faible de la molécule. L'utilisation de polymères est donc une étape indispensable pour obtenir une libération continue de la molécule d'intérêt sur une période de 48h à plusieurs jours. En conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, une large série d'étude a été réalisé in vitro pour déterminer les concentrations libérées : 4 candidats ont ainsi été sélectionnés pour déterminer les quantités de molécules libérées in vivo. Cette première étude se fera sur 6 rats mâles Sprague-Dawley par groupe (soit 24 rats). Si les dosages ne permettent pas de délivrer suffisamment de molécule, 4 autres polymères supplémentaires seront éventuellement testés. Une fois les polymères sélectionnés, l'efficacité de la molécule à long terme sera étudiée chez le rat après ischémie cérébrale. 2 polymères dont la libération sera courte (48h) et longue (>1 semaine) ainsi que leur contrôle respectif seront administrés chez le rat après ischémie cérébrale. 36 rats mâles Sprague-Dawley par groupe seront nécessaires pour obtenir des données statistiques fiables et pallier à la variabilité intrinsèque due au modèle d'ischémie cérébrale. Au total 192 rats mâles Sprague-Dawley seront inclus dans cette étude (48 pour l'étude de pharmacocinétique et 144 pour l'étude d'efficacité à long terme de notre molécule). L'objectif final est de pouvoir amener cette molécule en phase clinique en s'appuyant sur les recommandations faites par le STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable, 2011).

581- Ce projet a pour but d'évaluer le bénéfice d'une supplémentation des solutions de conservation des greffons jusqu'à l'instant de leur réimplantation sur un modèle porcin d'allogreffe.

La transplantation hépatique est le traitement de choix des insuffisances hépatiques aiguës graves ou chroniques parvenues à un stade terminal. La qualité du greffon implanté est un facteur déterminant du succès de la greffe. La qualité du greffon dépend de la qualité intrinsèque de l'organe chez le donneur au moment de son prélèvement ainsi que des conditions de sa conservation jusqu'à l'instant de sa réimplantation. La conservation statique à froid est le principal mode de conservation du greffon hépatique. Elle consiste à rincer, puis conserver le greffon de manière statique, à l'aide d'une solution de conservation adaptée. Les solutions de conservation les plus utilisées dans le monde sont la solution UW (Université du Wisconsin) et la solution HTK (Histidine-Tryptophan-Kétoglutarate).

Le but de ce travail est d'étudier l'intérêt de la supplémentation des solutions de conservation lors de la conservation statique à froid de greffons hépatiques sur l'amélioration de la fonction initiale du greffon dans un modèle d'allogreffe orthotopique chez le porc.

Pour ce projet un modèle d'allogreffe hépatique orthotopique chez le porc sera utilisé. La solution de conservation des greffons utilisée est l'UW. Le but de ce projet est de comparer les performances de la solution de conservation UW seule (groupe contrôle) ou supplémentée (groupe expérimental) lors de la conservation statique à froid de greffons hépatiques pendant 6 à 7 heures sur un modèle porcin d'allogreffe (soit 2 groupes avec 12 animaux par groupe c'est-à-dire 12 donneurs et 12 receveurs; soit un nombre prévisionnel maximum de 120 animaux sur 5 ans).

L'amélioration de la conservation devrait se traduire par la réduction de l'intensité du syndrome de reperfusion (mécanisme de dégradation au moment de la revascularisation du greffon), une amélioration des paramètres de fonction initiale et un retour plus rapide aux valeurs normales de la fonction hépatique.

Ce projet est réalisé sur le porc car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour évaluer le bénéfice d'une supplémentation des solutions de conservation des greffons jusqu'à l'instant de leur réimplantation. A ce jour, le porc est une des espèces les plus adaptées à la réalisation d'allogreffe hépatique orthotopique. De plus, le porc présente de nombreuses similitudes physiologiques et anatomiques avec l'homme.

Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement).

582- Le test de toxicité anormale sur rongeurs (souris ou souris + cobayes) est décrit dans les Pharmacopées européenne, américaine, qui sont les référentiels pharmaceutiques pour la réalisation des tests de contrôle qualité.

L'objectif de ce test est de détecter une éventuelle toxicité d'un produit pharmaceutique, après son administration aux animaux. Les produits administrés aux animaux sont des produits pharmaceutiques déjà sur le marché, et nous recherchons donc par ce test une toxicité anormale, c'est-à-dire que nous nous attendons à prouver l'innocuité du produit.

Selon les Pharmacopées ou les protocoles clients, le test peut être réalisé sur un groupe de souris, ou sur les espèces souris et cobayes en parallèle. Le principe général du test est le suivant:

Administration du produit pharmaceutique aux animaux, selon la voie et le volume décrits dans le dossier du client (dossier d'AMM réglementaire)

Observation des animaux pendant la durée prescrite par le client dans son dossier d'AMM (entre 1 et 15 jours environ en fonction des prescriptions).

Cet essai ne peut pas aujourd'hui être réalisé ex vivo pour plusieurs raisons: Il n'existe pas aujourd'hui d'équivalent in vitro au test de toxicité anormale. Il s'agit d'un test réglementaire, obligatoire à partir du moment où il est enregistré dans le dossier d'AMM (autorisation de mise sur le marché) du produit.

Les animaux sont hébergés en groupes sociaux dans des cages qui respectent les normes de la directive EU 2010/63, avec du matériel de nidification comme enrichissement. Ils sont observés chaque jour par du personnel formé et compétent et des points limites sont mis en place. Seul le nombre d'animaux minimum est utilisé, pour être conformes aux pharmacopées et le nombre d'animaux qui seront nécessaires au projet sera d'environ 20 000 souris et 5 000 cobayes.

583- Dans le cadre des activités de prestation de service de notre institut, il nous été demandé de développer des tests d'étude de la cicatrisation. Classiquement, les études de cicatrisation se font sur la peau

Objectif :

Le test que nous souhaitons développer est l'étude des plaies par excision, essentiellement au travers d'une analyse morphologique macroscopique (in vivo) et microscopique (post mortem).

Principe du test

Le principe est de retirer une biopsie de peau (5 mm de diamètre) sur la souris anesthésiée et d'étudier la régénération de la plaie.

Les équipes analysent quotidiennement l'évolution des plaies en notant : les étapes de cicatrisation, la survenue d'évènements inattendus. A différents temps, des animaux seront euthanasiés et les plaies collectées pour analyses microscopiques.

Apport du projet :

Educatif :

Entraîner à la réalisation des plaies, à l'évaluation de l'évolution des plaies, et à l'analyse des résultats.

Choisir les colorations histologiques les plus pertinentes.

Technique :

Identifier les temps de survenue des différentes étapes de cicatrisation

Définir la taille de cohorte nécessaire pour pouvoir conclure

Construire les tables d'analyses

Rédiger un protocole d'analyses

Principe du protocole de développement

1. apprentissage de la réalisation des plaies et évaluation de la cinétique de cicatrisation.

La réalisation des plaies doit être standardisée autant que possible.

Cohorte de mise en place

Deux biopsies de peau seront réalisées sur le dos de 10 souris adultes (5 males et 5 femelles). Les animaux seront suivis quotidiennement jusqu'à cicatrisation complète (7 à 10 jours) ; une photo sera prise quotidiennement afin de faciliter l'analyse. Cette cohorte est nécessaire afin (1) d'entraîner le personnel, identifier les difficultés et apporter des solutions, et (2) d'évaluer la dynamique dans le temps de la cicatrisation sur nos animaux, dans notre laboratoire. Nous pourrions également évaluer la variabilité dans la survenue des différentes étapes. Cette cohorte nous permettra de raffiner notre protocole, ainsi que d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires

Cohortes d'apprentissages

Trois cohortes de 10 souris seront établies selon le même protocole afin (1) de mettre en application les modifications apportées à la suite de l'analyse de la première cohorte, (2) de vérifier la reproductibilité des résultats déjà obtenus, (3) de poursuivre l'entraînement du personnel et améliorer leur pratique ; et enfin, (4) enrichir le set de données préliminaires.

Ces cohortes permettront

(i) de former le personnel

(ii) de mieux cerner les points clés d'analyse

(iii) d'affiner le nombre d'animaux nécessaire

2. suivi de l'évolution des plaies au niveau microscopique

Nous prévoyons d'étudier 5 souris par sexe (standard minimal recommandé pour les études morphologiques) aux jours 1, 2, 3, 4, 5, 7, et 10 après lésions, une cohorte de 70 souris sera donc mise en place de la même manière que les précédentes. Un échantillon par souris servira à l'évaluation microscopique (établissement d'une collection de plaies normales à différentes étapes de cicatrisation). Un échantillon sera conservé à -80°C afin de permettre des analyses biochimiques ultérieures (évaluation de l'intérêt et de la puissance de tests biochimiques divers).

3. Cohorte expérimentale : étude pilote

Un projet pilote sera lancé en collaboration avec un de nos clients. Pour les deux sexes, 15 souris sauvages et 15 souris portant des allèles inactivées (KO) pour les gènes Fpr2 et Fpr3 (formyl peptide receptor) (total 60 souris) seront fournies afin de tester notre capacité à traiter un projet expérimental complet en situation réelle. Les souris Fpr2 KO sont connues pour avoir une immunité altérée (ce qui n'entraîne pas de souffrance en soit); aucun phénotype n'est décrit chez les souris Fpr3 KO. Les souris double mutantes devraient donc avoir une immunité altérée que nous chercherons à étudier au travers de ce protocole.

584- Chez les Vertébrés, le maintien du corps en équilibre est un aspect fondamental de la survie. Pour garantir ces capacités, il est nécessaire de contrôler en permanence la position de la tête et des yeux dans l'espace. Ceci est possible grâce à l'interaction de plusieurs modalités sensorielles dont la principale se situe au niveau de l'oreille interne.

Suite à une lésion unilatérale du labyrinthe de l'oreille interne, un syndrome oculomoteur et postural caractéristique apparaît. Ce syndrome récupère au cours des jours suivants, assurant une récupération fonctionnelle, c'est la « compensation vestibulaire ». La compensation vestibulaire sert de modèle d'étude à la compréhension des mécanismes cellulaires de plasticité post-lésionnelle, plasticité rencontrée dans des situations pathologiques qui correspondent à différents types de lésions affectant le système nerveux central: inflammations, traumatismes, tumeurs, accidents vasculaires, maladies auto-immunes ou neuro-dégénératives. Le 1er but du protocole proposé est d'évaluer à l'aide de méthodes quantitatives les conséquences fonctionnelles de lésions vestibulaires précoces, ainsi que la récupération fonctionnelle des réflexes vestibulaires chez le poulet juvénile. Le choix du poulet comme modèle d'étude se justifie par le fait que chez cette espèce, environ 50% des individus lésés récupèrent alors que 50% ne récupèrent pas. Cette différence reste largement inexplicée, et demande à être objectivée par des critères quantitatifs de mesure du réflexe vestibulo-oculaire et du réflexe vestibulo-colique. Elle permet d'aborder la question cruciale en clinique de la variabilité interindividuelle rencontrée en clinique chez l'homme. Dans une 2nde partie, nous souhaitons comparer les effets de lésions à différents stades de développement afin de mesurer les éventuelles déformations squelettiques générées. Nos travaux chez la grenouille suggèrent en effet qu'un déséquilibre vestibulaire précoce pourrait être à l'origine de scolioses idiopathiques. Nous menons actuellement des essais cliniques sur des adolescents scoliotiques qui semblent confirmer ce lien de causalité. Nous mettons actuellement au point les techniques de lésion dans l'œuf

à des stades très précoces de développement. Nous pourrions ainsi disposer d'un nouveau modèle animal de scoliose présentant le double avantage d'être terrestre et bipède.

Ce projet a été développé de façon à respecter la règle des « 3R » : 1) Remplacement : ces expériences comportementales doivent être conduites sur modèle animal, et ne peuvent à l'heure actuelle pas être remplacées par des techniques alternatives 2) Réduction : nous anticipons l'utilisation de 80 animaux répartis en 3 groupes expérimentaux et testés au cours de 2 protocoles comportementaux, le but étant d'atteindre un nombre statistiquement suffisant de  $n=20$  / tests fonctionnels. Ce nombre constitue un minimum en deçà duquel les conclusions statistiques de l'étude seraient mises en cause. 3) Raffinement : les protocoles établis limitent au maximum la souffrance des poulets. L'intervention chirurgicale se fera sur des animaux profondément anesthésiés; des antalgiques sont prévus en post-opératoire. Des soins particuliers sont apportés suite à la lésion afin de s'assurer que les poulets se nourrissent et s'hydratent correctement. Une surveillance individuelle est effectuée suite à la lésion par des spécialistes des oiseaux. Enfin des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

585- L'épilepsie de la face mésiale du lobe temporal (MTLE) est une des formes d'épilepsies parmi les plus réfractaires aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle-seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique.

Le modèle dit kainate constitue un modèle validé de cette forme d'épilepsie chez la souris. Il consiste en l'injection d'une microgoutte d'acide kainique dans le cerveau d'un animal sain, rendant l'animal épileptique dans le mois qui suit, avec les mêmes symptômes que ceux observés dans le cadre des MTLE humaines.

Jusqu'à présent, le modèle n'a été étudié que sur une seule lignée de souris ne permettant pas d'envisager l'importance de l'influence génétique. Le but de cette étude est d'étudier ce modèle MTLE sur huit lignées de souris consanguines ( $n=12$  souris par lignée ; donc 96 souris au total), permettant d'évaluer l'impact du patrimoine génétique sur cette épilepsie.

L'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites. Le choix d'utiliser la souris comme modèle animal répond à l'objectif d'utiliser l'espèce la "moins sensible". Il n'est pas envisageable d'utiliser une approche in vitro en suppléance à l'approche in vivo. Le nombre d'animaux inclus dans le projet a été minimisé pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses.

586- La qualité nutritionnelle des aliments contribue de manière importante à l'amélioration des conditions de production des animaux élevés à des fins agronomiques, de leur santé et de leur bien-être. L'indice de consommation est un critère direct de cette qualité. Un gain de poids avec le moins d'aliment possible reflète une utilisation digestive améliorée, une bonne santé digestive et une qualité de la litière bénéfique à la santé et le bien-être des animaux.

La mise en évidence de l'amélioration de l'indice de consommation chez le poulet ou le dindon dans le dispositif proposé permet d'obtenir, avec un peu d'animaux, des résultats concluants sur l'utilisation des nutriments en présence d'un nouvel aliment, d'un additif ou d'un traitement particulier de l'aliment.

L'indice de consommation chez les volailles évolue de manière exponentielle les premières semaines d'âge. C'est pourquoi une évaluation de 8 à 20 jours (ou jusqu'à 28 jours chez le poulet label ou le dindon) est la plus pertinente.

Il s'agit de mesurer les performances de croissance de J8 à J20 (consommation, gain de poids et indice de consommation) au niveau individuel. La consommation d'aliment est mesurée à J8 (après 1h de consommation), J9 (24h), J10 (48h), J11 (72h), puis tous les trois jours à J14, J17 et J20. Le poids des animaux est mesuré en début (J8) et fin d'essai (J20).

Le dispositif de l'essai CA est un dispositif en blocs : 4 traitements x 12 répétitions (1 répétition = 1 poulet). Le nombre d'animaux a été calculé de manière à mettre en évidence un écart de 3% de l'indice de consommation (sur la base de nos propres résultats), niveau suffisant d'un point de vue biologique et zootechnique.

Le nombre maximal d'animaux pouvant être utilisés dans ce type de protocole est de :

Nombre d'animaux par essai = 12 animaux/traitement x 4 traitements = 48

Nombre d'animaux par an = 48 animaux/essai x 6 essais = 288

Nombre d'animaux sur 5 ans = 288 animaux/an x 5 ans = 1440

Dans ce projet une seule procédure peut avoir un effet sur le bien-être des animaux : le logement en cages individuels dès leur arrivée jusqu'à la fin de l'essai (28 jours maximum). A l'arrivée, les animaux sont logés par groupe de trois pour les habituer à l'environnement de la cage à l'âge où leurs capacités cognitives sont les plus

développées. Ensuite (8 jours d'âge) ils sont logés individuellement pour suivre la consommation individuelle. Les animaux peuvent se déplacer, se coucher et se lever, s'étirer, manger et s'abreuver aisément. Les cages permettent une perception visuelle, auditive et olfactive des congénères, la surveillance est journalière (y compris les weekends) avec la visite de l'animalier plusieurs fois par jour, la manipulation de mangeoires et abreuvoirs, permet une habituation des animaux à la présence humaine. Les animaux sont élevés en conditions de température et hygrométrie adaptées à leur stade physiologique et un régime lumineux adapté (J0 à J2 : 24h de lumière ; J3 à J20 : 14h de lumière et 10h d'obscurité). L'eau et la nourriture est disponible en permanence. Par ailleurs, un objet d'enrichissement est installé dans chaque cage.

587- Une lésion cutanée (ou plusieurs) par « punch biopsy » sera réalisée sur le dos de souris ou de rats. L'épiderme et le derme seront retirés en évitant de léser la couche musculaire sous-jacente.

Les composés à tester seront administrés ou appliqués en topique afin d'évaluer leur impact sur la pathologie. Ce protocole sera réalisé sur des animaux sains ou diabétiques ou autres, l'évolution de la cicatrisation pourra être évaluée jusqu'à 30 jours.

Chaque étude sera réalisée avec un nombre maximum de 80 animaux répartis en 8 groupes de 10 animaux traités en parallèle. Plusieurs études successives seront réalisées pour obtenir une caractérisation de l'actif; un nombre total de 400 animaux par actif sera testé. Le nombre total des animaux pour le projet est estimé à 5000 rats et 7000 souris (sur 5 ans).

Certains modèles cellulaires de prolifération, de différenciation, de migration, d'inflammation seront réalisés dans le contexte de la règle des 3R pour évaluer l'activité d'actifs et cribler les meilleurs. En revanche, ces modèles cellulaires ne permettent pas de réconcilier toutes les phases du processus de cicatrisation, y compris le remodelage cutané.

Donc, au delà des tests in vitro, un modèle physiopathologique in vivo est nécessaire, et le processus de cicatrisation est initié après lésion cutanée par perte de substance.

En fonction du protocole, un traitement avec les composés à tester sera réalisé en parallèle au développement de la pathologie, ou sur une pathologie déjà installée. Le traitement pharmacologique sera sub-chronique ou chronique, et un suivi voire une prise en charge de la douleur par une analgésie appropriée au contexte expérimental sera réalisé. Plusieurs paramètres seront évalués: suivi clinique des animaux, surface de la plaie, histologie et biomarqueurs notamment. Lorsque les résultats seront conclusifs, les groupes de traitement pharmacologiques ne seront pas réévalués pour réduire le nombre d'animaux utilisés au total.

Après un temps déterminé par le protocole, les animaux seront, soit anesthésiés si un prélèvement biologique (sang par exemple) est nécessaire, soit directement euthanasiés et les organes / tissus d'intérêt seront prélevés.

588- Dans le cadre de la recherche en oncologie constituant l'axe thérapeutique prioritaire de l'établissement, le point de départ de tout projet visant à moduler des cibles humaines pertinentes en oncologie au moyen d'anticorps thérapeutiques est la génération chez l'animal de séries d'anticorps monoclonaux (MAbs) dirigés contre cette cible. La spécificité des anticorps produits est ensuite évaluée par des techniques in vitro au moyen de lignées cellulaires, de cellules transfectées, de protéines ou de peptides.

Après plusieurs injections avec un immunogène de choix, les souris/rats immunisés développent une réponse immunitaire classique. Cette réponse permet l'activation des lymphocytes B sécrétant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre l'agent immunogène. A la fin du protocole d'immunisation, la réponse immunologique développée contre l'antigène par l'animal est évaluée par ELISA ou cytométrie en flux. Après euthanasie de l'animal, les organes lymphoïdes (rate et/ou ganglions) seront prélevés comme source de lymphocytes B activés. Divers agents immunogènes peuvent être utilisés : des protéines solubles, des protéines de surface cellulaire, des acides nucléiques, des cellules eucaryotes, des bactéries, des virus ...

Deux voies d'injections peuvent être utilisées : intra-péritonéale et sous-cutanée.

L'immunisation des souris/rats permettra la production de sérums polyclonaux et/ou la génération d'anticorps monoclonaux.

Chaque protocole d'immunisation nécessite l'utilisation de 8 souris immunocompétentes ou de 4 rats par type d'immunogène testé et le nombre d'immunogènes est limité à 5 par projet. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum tout en conservant un nombre suffisant d'individus pour conserver la diversité génétique nécessaire à la bonne réalisation du projet. Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet pour une durée de 5 ans est estimé à 500 souris et 250 rats.

Lors de cette évaluation, une observation quotidienne des animaux par un personnel qualifié et sensibilisé à l'éthique animale permet de garantir le respect du bien-être animal ; la mise en place d'un enrichissement social et environnemental optimum et le respect de points limites conduisent à ce que les niveaux de stress et de douleur sont considérés comme modérés.

#### 589-1-Objectif scientifique du projet:

La Nétrine-1 est le ligand du récepteur à dépendance DCC. En tant que récepteur à dépendance, DCC présente la particularité d'induire l'apoptose des cellules en absence de Nétrine-1. Nous avons montré que la Nétrine, protéine surexprimée dans différents types de tumeur, n'était pas produite dans le pancréas normal mais était progressivement exprimée dans les lésions pancréatiques précancéreuses et cancéreuses. Ceci suggère que le blocage de l'apoptose induite par DCC peut jouer un rôle dans la tumorigenèse pancréatique. L'objectif de ce projet est de tester si la surexpression de Nétrine ou l'expression d'un mutant de DCC (DCCmut), présentant une perte de fonction apoptotique, permet d'accélérer le développement des lésions pancréatiques induites par l'oncogène KRASG12D grâce à 2 modèles de souris transgéniques.

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

L'adénocarcinome du pancréas est une tumeur solide très agressive représentant la 5ème cause de mortalité par cancer et est résistante à tous les traitements conventionnels. La moitié des patients décède moins de six mois après le diagnostic. L'identification de facteurs facilitant la carcinogenèse pancréatique (hypothèse de la Nétrine pour ce projet) représente donc un réel enjeu pour les années à venir.

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

Le modèle murin de prédisposition (mutation activatrice KRASG12D) choisi pour cette étude reproduit parfaitement la pathologie humaine puisque c'est l'introduction d'une mutation retrouvée dans plus de 90% des patients atteints de cancer du pancréas qui induit la formation des lésions précancéreuses chez la souris. A l'image de ce qui est observé chez l'humain, les lésions précancéreuses pancréatiques qui se développent chez les souris KRASG12D sont microscopiques, indolores et n'entraînent aucun signe clinique. Pour bloquer l'apoptose induite par DCC, un transgène surexprimant la Nétrine sera activé dans le pancréas de ces souris (animaux KRASG12D+Nétrine) ou un mutant de DCC sera exprimé dans ce contexte KRASG12D.

Trois procédures expérimentales seront mises en place :

- 1) Une procédure « pilote » sur un petit nombre de souris mis à mort à différents âges afin d'établir une chronologie de l'évolution des lésions précancéreuses en présence du transgène.
- 2) Une étude de « validation » sur un plus grand nombre d'animaux mis à mort à l'âge auquel les lésions sont le plus informatives et qui permettra une analyse statistique.
- 3) La génération d'une cohorte de « vieillissement » afin d'établir des courbes de survie. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition des points limites décrits ci-après (prostration, perte de poids, etc...).

Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Un suivi de poids hebdomadaire sera mis en place. Pour chaque animal, les organes susceptibles de porter des métastases seront également prélevés (foie, intestin, rate). Pour chaque animal, plusieurs marquages histologiques seront effectués sur les prélèvements pour un raffinement maximal. Deux facteurs objectifs seront pris en compte afin de déterminer l'effet de la surexpression de la Nétrine ou du blocage de l'apoptose induite par DCC: 1) Le nombre de lésions précancéreuses par unité de surface de pancréas; 2) Les proportions des lésions de chaque grade. Les pancréas issus des animaux KRASG12D+Nétrine ou KRASG12D+DCCmut seront comparés à ceux des animaux KRASG12D et Nétrine ou DCCmut.

Ce projet bénéficiera de toute l'expertise des personnels impliqués dans ces élevages.

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

Au total, 90 (procédure 1) + 150 (procédure 2) + 90 (procédure 3) = 330 souris seront utilisées dans ce projet. Ces souris d'intérêt seront générées par nos soins.

#### 590-1-Objectif scientifique du projet:

La protéine Y est surexprimée dans différents types de tumeurs et favorise la survie des cellules cancéreuses. Cette protéine constitue donc une cible thérapeutique anti-cancéreuse attractive. Un nouvel anticorps bloquant (désigné ci-après sous le terme composé X) a été développé pour inhiber les fonctions de la protéine Y. Il a été montré que le composé X pouvait efficacement inhiber l'effet oncogénique de la protéine Y dans les neuroblastomes, les cancers du sein métastatiques et certains cancers du poumon grâce à des expériences in vitro et in vivo.



Nos travaux préliminaires ont également montré que la protéine Y n'était pas produite dans le pancréas normal mais était progressivement exprimée dans les lésions pancréatiques précancéreuses et cancéreuses. L'objectif de ce protocole est, à l'aide de modèles murins de xéno greffes, i) d'étudier l'effet oncogénique de la protéine Y et ii) de tester in vivo l'efficacité anti-tumorale du composé X dans le cas de la carcinogenèse pancréatique

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

L'adénocarcinome du pancréas est une tumeur solide très agressive représentant la 5ème cause de mortalité par cancer et résistante à tous les traitements conventionnels.

La moitié des patients décède moins de six mois après le diagnostic ce qui fait de l'adénocarcinome du pancréas l'une des tumeurs au pronostic le plus sombre.

La caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas représente donc un réel enjeu clinique pour les années à venir.

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

Des tests réalisés in vitro ont montré i) que la protéine Y jouait le rôle de facteur de survie pour les cellules tumorales et que ii) le composé X était capable d'induire la mort des cellules tumorales en bloquant la protéine Y. Cependant, l'utilisation d'un modèle murin est nécessaire pour déterminer in vivo l'efficacité de ce traitement dans le cadre d'une approche préclinique.

Les modèles murins de xéno greffes sont des modèles simples permettant de tester, sur un nombre limité d'animaux, l'efficacité d'un traitement dans le cadre d'une approche « preuve de concept préclinique ». 6 modèles cellulaires ont été sélectionnés sur la base de données obtenues in vitro (profil d'expression de gènes d'intérêt, index de prolifération, capacités de migration et d'invasion). Dans un premier temps et afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous comparerons, dans le cadre d'une expérience pilote, l'efficacité de la prise de greffes de deux concentrations de cellules –choisies à partir de données bibliographiques-, afin de vérifier celle conduisant à une prise tumorale suffisamment rapide et homogène qui nous permettra de réaliser les traitements dans un second temps. Ce test sera réalisé sur 2 groupes de 5 souris pour chacun des 6 types cellulaires. Une fois le test de prise tumorale validé, nous réaliserons l'étude sur deux groupes de 10 souris pour chaque type cellulaire, ce qui est suffisant pour mettre en évidence de manière statistique une différence éventuelle entre le groupe placebo et celui traité avec le composé X.

Conformité avec la règle des 3R :

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduction), nous comparerons l'efficacité de la prise de greffes de deux concentrations de cellules –choisies à partir de données bibliographiques- sur un petit groupe d'animaux tests, afin de sélectionner celle conduisant à une prise tumorale suffisamment rapide et homogène et qui nous permettra de réaliser les traitements dans un second temps sur un nombre minimal d'animaux.

Une fois le test de prise tumorale validé, nous réaliserons l'étude sur deux groupes de 10 souris pour chaque type cellulaire, ce qui est suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Par ailleurs et toujours afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les tumeurs xéno greffées seront collectées à la fin du traitement après mise à mort des animaux, et fixées de manière à comparer leurs caractéristiques histologiques et à quantifier notamment i) l'apoptose et la nécrose intra-tumorale, et ii) l'index de densité vasculaire (Réduction/Remplacement).

Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux seront surveillés étroitement tous les 2 jours maximum, afin de repérer d'éventuels signes de souffrance (prostration, perte de poids...). En cas d'apparition de tels signes de souffrance ou de dépassement de point limite (taille de la tumeur supérieure à 17mm), les animaux seront mis à mort (Raffinement).

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

Au total, 204 souris seront utilisées, 60 pour le test de prise de greffe (6x10) et 144 (6x24) pour le traitement, les 4 ayant les tumeurs les moins homogènes avec le reste du groupe étant euthanasiées avant le début du traitement au cours de chaque expérience.

591- Une nouvelle technologie est issue de plusieurs années de recherche sur les disques intervertébraux et de plusieurs expériences de remplacement du nucleus.

Un gel de polymère a été mis au point et est destiné à restaurer l'environnement, la pression et l'hydratation d'un disque lombaire afin de restaurer l'environnement des cellules et rétablir un fonctionnement quasi normal d'une cellule âgée indolore. La compréhension actuelle de la pathologie, de la cascade des événements biologiques impliqués dans le processus dégénératif et dans la douleur, supporte de façon très solide ce concept. Cette expérimentation animale est prévue pour assurer le transfert vers l'application clinique.

Le gel est destiné à traiter les millions de patients avec des disques lombaires douloureux et à réduire l'impact du vieillissement du disque intervertébral, notamment au niveau de la douleur lombaire. Aujourd'hui, la douleur Lombaire Chronique affecte environ 7 % de la population, soit 57 millions de personnes aux USA, Europe et Japon ; en 2002 ces patients atteindront 60 millions.

La douleur lombaire chronique représente la plus grande cause de limitation de l'activité, et atteint des gens assez jeunes, 45 ans, soit la tranche de la population active, et représente la seconde cause de visite d'un médecin, la cinquième cause d'hospitalisation. La douleur lombaire chronique est associée à plus de 19 % des jours d'arrêt de travail. Incluant l'ensemble des coûts directs et indirects, il est estimé que la douleur chronique lombaire pèse de 20 à 25 milliards d'Euros par an en Allemagne.

La technique envisagée dans ce protocole est très simple puisqu'elle consiste en une injection dans le disque exactement comme pour une discographie, donc accessible pour l'ensemble des chirurgiens et donc des patients. L'expérimentation animale permettra de valider par des tests aux normes ISO le gel dans son indication et de valider l'efficacité du gel sur les cellules discales.

Parallèlement aux tests biomécaniques et de biocompatibilité, une étude animale (une phase pilote puis une phase principale appelée « Pivotal ») a pour objectif de démontrer l'effet bénéfique du gel, de la rétention d'eau, de la restauration de l'environnement notamment la pression sur les cellules du disque, sur leur capacité à entretenir un matériel quasi normal et fonctionnel.

10 moutons sont prévus pour cette expérimentation, enfin d'avoir suffisamment des données pour assurer le transfert vers l'application clinique. Aucun test d'autres qu'in vivo est envisageable pour évaluer le gel développé, car un modèle in situ ou ex vivo ne permettra pas d'étudier les propriétés biomécanique du gel.

592- Ce projet concerne le développement non-clinique réglementaire de produits pharmaceutiques et agro-alimentaires selon les référentiels de l'OCDE, ICH, EMEA et de la Pharmacopée Européenne.

Cobayes : 1700 ; Hamsters : 100 ; Lapins : 1250 ; Rats : 6525 ; Souris : 10725 seront utilisés dans ce projet.

Cobayes :

- Etudes de Contaminants viraux de thérapies cellulaires (2 groupes de 6 animaux par produit ; 6 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la présence éventuelle de contaminants viraux dans des préparations cellulaires à visée de thérapie cellulaires humaines, selon les référentiels réglementaires de la Pharmacopée Européenne. Les cellules sont alors injectées par voie intrapéritonéale (IP), intracrâniale (IC) et/ou intramusculaire (IM) chez la souris adulte, nouveau-né et le cobaye (Pharmacopée Européenne).
- Etudes de Biodistribution (5 groupes de 10 animaux par évaluation de produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la biodistribution d'un produit après une administration. Les animaux sont sacrifiés à un temps défini après la dernière administration, les organes sont collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites.
- Etudes d'Immunogénicité [8 groupes de 5 animaux par évaluation de produits (différentes stabilités) ; 5 produits sur 5 ans]. La procédure expérimentale consiste à évaluer l'immunogénicité de vaccins (injections sous-cutanée, intradermique, intra-musculaire, administrations orale et sublinguale) après administration unique ou répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (EMEA).
- Etude de sensibilisation (5 groupes de 10 animaux par projet ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'irritabilité oculaire, cutanée ou l'irritation de muqueuses ou bien la sensibilisation après l'administration d'un produit (OCDE No. 404, 405, 429).
- Etude de toxicité chronique (10 mâles et 10 femelles/groupe ; 9 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la toxicité après administration répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (OCDE No. 408, 452, EMEA, ICH).

Hamsters :

- Etudes d'irritabilité chronique des muqueuses buccales (2 groupes de 6 animaux par projet ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'irritabilité oculaire, cutanée ou l'irritation de muqueuses ou bien la sensibilisation après l'administration d'un produit (OCDE No. 404, 405, 429).

Rats :

- Etudes de toxicité aiguë (3 mâles et 3 femelles par groupe ; 5 groupes par produit ; 15 produits sur 5 ans). 6 animaux par groupe ; 5 groupes par produit : un premier animal/sexe est testé avec la dose la plus forte. Si cette

dose est toxique, le second animal/sex du groupe sera traité avec une dose inférieure. Si cette dose n'est pas toxique, deux autres animaux/sexes seront traités. Le nombre de groupes indiqué (5) est maximal et peut donc être réduit à un seul groupe si le produit n'est pas toxique.

- Etudes de toxicocinétique (10 mâles et 10 femelles par groupe ; 3 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la toxicocinétique d'un produit après une administration. Les animaux sont sacrifiés à différents temps, les organes, fèces et urines collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites. Des études préliminaires permettent de limiter le nombre de groupes et les organes à évaluer (OCDE No. 417).

- Etudes d'immunogénicité (5 ou 10 animaux par groupe ; 2 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'immunogénicité de vaccins (injections sous-cutanée, intradermique, intra-musculaire, administrations orale et sublinguale) après administration unique ou répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (EMEA).

- Etudes de biodistribution (10 mâles et 10 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la biodistribution d'un produit après une administration. Les animaux sont sacrifiés à un temps défini après la dernière administration, les organes sont collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites.

- Etudes de toxicité sub-chronique jusqu'à 3 mois (10 mâles et 10 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 25 produits sur 5 ans)

Etudes de toxicité chronique de 6 mois (20 mâles et 20 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la toxicité après administration répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (OCDE No. 408, 452, EMEA, ICH)

- Etude de reprotoxicité (25 mâles et 25 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la reprotoxicité d'un produit après administration à long terme (Jusqu'à trois mois) sur les parents, et les générations suivantes (F1, F2, F3 éventuellement selon les produits) (OCDE No. 416).

- Etude de cancérogenèse (25 mâles et 25 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la carcinogénèse d'un produit après administration tout au long de la vie de l'animal selon les référentiels réglementaires (OCDE No. 451).

Souris :

- Etudes de biodistribution (10 mâles et 10 femelles par groupe ; 2 groupes par produit ; 25 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la biodistribution d'un produit après une administration. Les animaux sont sacrifiés à un temps défini après la dernière administration, les organes sont collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites.

- Etudes de Contaminants viraux de thérapies cellulaires (2 groupes de 10 animaux adultes + 2 groupes de 10 animaux nouveau-nés + 2 groupes de 10 animaux nouveau-nés pour sub-inoculation par produit (+ 6 mères) ; 75 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la présence éventuelle de contaminants viraux dans des préparations cellulaires à visée de thérapies cellulaires humaines, selon les référentiels réglementaires de la Pharmacopée Européenne. Les cellules sont alors injectées par voie intrapéritonéale (IP), intracrâniale (IC) et/ou intramusculaire (IM) chez la souris adulte, nouveau-né et le cobaye (Pharmacopée Européenne).

- Etudes d'immunogénicité (5 ou 10 animaux par groupe ; 2 groupes par produit ; 125 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'immunogénicité de vaccins (injections sous-cutanée, intradermique, intra-musculaire, administrations orale et sublinguale) après administration unique ou répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (EMEA).

- Etudes de toxicocinétique (10 animaux par groupe ; 3 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la toxicocinétique d'un produit après une administration. Les animaux sont sacrifiés à différents temps, les organes, fèces et urines collectés pour analyser la présence du produit et de ses métabolites. Des études préliminaires permettent de limiter le nombre de groupes et les organes à évaluer (OCDE No. 417).

- Etudes de toxicité aiguë (2 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 150 produits sur 5 ans). 2 animaux par groupe ; 5 groupes par produit : un premier animal est testé avec la dose la plus forte. Si cette dose est toxique, le second animal du groupe sera traité avec une dose inférieure. Le nombre de groupes indiqué (5) est maximal et peut donc être réduit à un seul groupe si le produit n'est pas toxique.

- Etudes de toxicité sub-chronique jusqu'à 3 mois (20 mâles et 20 femelles par groupe ; 4 groupes par produit ; 20 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer la toxicité après administration répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (OCDE No. 408, 452, EMEA, ICH).

- Etudes de tumorigénicité (10 animaux par groupe ; 2 groupes par produit ; 75 produits sur 5 ans). Afin de vérifier l'absence de tumorigénicité de thérapies cellulaires humaines, une injection (généralement sous-cutanée) est faite chez la souris athymique afin d'évaluer l'absence de risque (Pharmacopée Européenne).

Lapins :

- Etudes d'irritation cutanée (3 animaux par groupe ; 1 groupe par produit ; 20 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'irritabilité oculaire, cutanée ou l'irritation de muqueuses ou bien la sensibilisation après l'administration d'un produit (OCDE No. 404, 405, 429).

- Etudes d'immunogénicité (3 ou 4 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). La procédure expérimentale consiste à évaluer l'immunogénicité de vaccins (injections sous-cutanée, intradermique, intra-musculaire, administrations orales ou sublinguales) après administration unique ou répétée d'un produit selon les référentiels réglementaires. Le schéma de traitement varie en fonction du schéma clinique utilisé chez l'homme, mais est généralement plus long. L'espèce animale est choisie en fonction du produit et de la dose administrée qui doit être représentative de la dose humaine (EMEA).

- Etudes d'irritation vaginale (5 animaux par groupe ; 3 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans)

- Etudes de toxicité sub-chronique de 3 mois (15 mâles et 15 femelles par groupe ; 2 groupes par produit ; 15 produits sur 5 ans)

593- La viande de volailles représente un tiers de l'alimentation carnée des français. La production biologique de viande de volaille est confrontée à plusieurs défis : le manque de références scientifiques, l'évolution de la réglementation qui impose une alimentation 100 % d'origine biologique pour les animaux et la dépendance forte aux importations de source de protéines notamment du tourteau de soja. L'alimentation représente 50 à 60 % du coût de production en volailles. Le projet ICOPP, financé par l'union européenne dans le cadre du programme Core Organic, vise à améliorer la contribution des aliments d'origine locale pour soutenir le passage à une alimentation 100 % biologique en élevage porcin et avicole.

L'établissement utilisateur (EU) est impliqué dans un volet de recherche de ce projet dont l'objectif est d'évaluer les contributions potentielles des parcours à la réponse aux besoins nutritionnels de différents génotypes de volaille. En élevage avicole biologique, les animaux ont accès à un parcours extérieur. Les végétaux présents sur les parcours sont consommés par les animaux et représentent une source de protéines non négligeable. L'objectif de notre projet est de mettre au point une méthode pour évaluer cette consommation en végétaux par les poulets de chair. Ce projet utilisera 40 poulets de chair au total. La méthode sera testée dans 4 conditions différentes (2 types génétiques \* 2 alimentations) correspondantes à des situations proches du terrain.

L'estimation de la consommation en végétaux concernera les animaux qui utilisent plus fréquemment le parcours. Dans le respect de la règle des 3R, la méthode mise au point permettra d'éviter l'euthanasie des animaux contrairement aux méthodes déjà existantes.

594- Ce projet concerne l'utilisation d'animaux à des fins de formations du Personnel aux gestes techniques de l'expérimentation animale.

10 cobayes, 10 hamsters, 10 lapins, 100 rats, 250 souris seront utilisés.

Cobayes :

- 2 séries de 5 cobayes seront utilisées pour la formation aux injections (intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, administration orale), la formation aux prélèvements sanguins et pour la formation au sacrifice et à la récupération d'organes selon le RITA, dont la rate pour des préparations de splénocytes en vue d'études d'immunogénicité.

Hamsters :

- 2 séries de 5 hamsters seront utilisées pour la formation aux administrations orales en vue d'essais d'irritation de la muqueuse buccale.

Lapins :

- 2 séries de 5 lapins seront utilisées pour la formation aux injections (intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, administration orale), la formation aux prélèvements sanguins et pour la formation au sacrifice et à la récupération d'organes selon le RITA, dont la rate pour des préparations de splénocytes en vue d'études d'immunogénicité.

Rats :

- 10 séries de 10 rats seront utilisées pour la formation aux injections (intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, intra-cardiaque, administration orale), la formation aux prélèvements sanguins, et pour la formation au sacrifice et à la récupération d'organes selon le RITA, dont la rate pour des préparations de splénocytes en vue d'études d'immunogénicité.

Souris :

- 25 séries de 10 souris seront utilisées pour la formation aux injections (intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée, intradermique, intra-cardiaque, administration orale), la formation aux prélèvements sanguins, et pour la formation au sacrifice et à la récupération d'organes selon le RITA, dont la rate pour des préparations des splénocytes en vue d'études d'immunogénicité.

Pour tous ces tests, le nombre minimum pour valider du Personnel a été défini, en relation avec les obligations réglementaire (ANSM). Les animaux ayant des injections de solution saline sont réutilisés pour valider plusieurs expérimentateurs, sous réserve du respect de l'absence de souffrance quelconque. Ces essais ne peuvent pas être remplacés par des tests in vitro substitutifs et sont impératifs pour mener à bien et dans de bonnes conditions éthiques les tests principaux d'efficacité et de toxicité réglementaire.

595- Ce projet concerne les preuves de concept d'activités thérapeutiques de nouvelles molécules avec des efficacités anticancéreuses, antibiotiques, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anti-ischémiques, protectrices de l'audition ou biocides. Il inclut également les études pharmacocinétiques réalisées préalablement à ces études d'efficacité.

Quantité d'animaux : Rats : 2540 ; Souris : 18300

Rats :

- Etude de Pharmacocinétique [6 animaux par groupe (4-5 prélèvements/rat) ; 2 groupes par produit/voie d'administration/dose ; 3 doses par produit ; 20 produits sur 5 ans). Afin de déterminer les doses optimales pour les études d'efficacité, des études pharmacocinétiques sont nécessaires. Elles permettront notamment de diminuer le nombre de groupes des études d'efficacité, en permettant d'optimiser le choix des doses et le schéma d'administration.

- Etude d'évaluation anticancéreuse (10 animaux par groupe ; 4 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules sur des tumeurs (humaines et murines), les cellules cancéreuses sont injectées chez l'animal (sous-cutanée ou orthotopique ; rat ou souris) et les animaux sont ensuite traités par les produits à tester. Ces modèles permettent de prédire l'activité antitumorale de nouveaux produits.

- Etude d'évaluation d'activités protectrices de l'audition (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules ayant un effet protecteur de l'audition (la perte d'audition est un effet secondaire observé dans certains traitements comme de chimiothérapies par exemple), les animaux sont traités par la chimiothérapie (par exemple) puis par le produit à tester. L'audition est monitorée (pose d'électrode sur le crâne) avant et après traitement. Des prélèvements sanguins sont effectués également avant et après traitement pour analyses biochimiques. Ce type de produit ne peut pas être testé in vitro (pas de modèle disponible) et nécessite donc l'utilisation d'animaux

Etude d'évaluation d'activités anti-ischémiques (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 5 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouveaux produits anti-ischémiques (thérapies cellulaires par exemple), une ischémie cardiaque est réalisée chez le rat avant d'injecter les cellules thérapeutiques dans l'apex du cœur. L'activité du produit est suivie par mesures des paramètres cardiaques. Ce protocole permet à la fois de montrer l'efficacité du produit mais également de pouvoir étudier la biodistribution, prérequis dans le cadre d'études réglementaires.

- Etude d'évaluation biocide (10 animaux par groupe ; 6 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouveaux produits biocides, les rats ont accès à la fois à l'alimentation normale et au produit biocide. Ces protocoles sont nécessaires pour le développement de produits anti-rongeurs. Ces données sont partie intégrante des dossiers de demande d'autorisation pour les biocides.

- Etude d'évaluation anti-diabétique (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules anti-diabétiques, une injection de Streptozotocine est réalisée chez

l'animal. Huit jours après, un prélèvement de sang est réalisé afin de doser la glycémie et l'insuline. Les animaux sont alors traités par les produits à tester. Une cinétique de prélèvement de sang est faite 24h après le traitement afin d'évaluer les taux de glycémie et d'Insuline, et d'évaluer ainsi les activités anti-diabétiques des produits testés.

Souris :

- Etude de Pharmacocinétique [3 animaux par groupe (1 prélèvement/souris) ; 10 groupes par produit/voie d'administration/dose ; 3 doses par produit ; 20 produits sur 5 ans). Afin de déterminer les doses optimales pour les études d'efficacité, des études pharmacocinétiques sont nécessaires. Elles permettront notamment de diminuer le nombre de groupes des études d'efficacité, en permettant d'optimiser le choix des doses et le schéma d'administration.

- Etude d'évaluation anticancéreuse (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 200 produits sur 5 ans)

- Etude d'évaluation antibactérienne (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 100 produits sur 5 ans).

Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules antibactériennes, les bactéries sont injectées chez l'animal (voies intrapéritonéale et intra-nasale ; souris) et les animaux sont ensuite traités par les produits à tester. Ces modèles permettent de prédire l'activité antibactérienne de nouveaux produits dans des modèles de Septicémie (voie intrapéritonéale) et de Pneumonie (voie intranasale).

- Etude d'évaluation biocide (10 animaux par groupe ; 6 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouveaux produits biocides, les rats ont accès à la fois à l'alimentation normale et au produit biocide. Ces protocoles sont nécessaires pour le développement de produits anti-rongeurs. Ces données sont partie intégrante des dossiers de demande d'autorisation pour les biocides.

- Etude d'évaluation anti-diabétique (10 animaux par groupe ; 5 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules anti-diabétiques, une injection de Streptozotocine est réalisée chez l'animal. Huit jours après, un prélèvement de sang est réalisé afin de doser la glycémie et l'insuline. Les animaux sont alors traités par les produits à tester. Une cinétique de prélèvement de sang est faite 24h après le traitement afin d'évaluer les taux de glycémie et d'Insuline, et d'évaluer ainsi les activités anti-diabétiques des produits testés.

- Etude d'évaluation anti-inflammatoire (10 animaux par groupe ; 4 groupes par produit ; 10 produits sur 5 ans). Afin d'évaluer l'activité de nouvelles molécules anti-inflammatoires, une inflammation aigüe est provoquée au niveau de la patte de la souris par injection de Carrageenan. Les animaux sont observés pendant 24h, puis sacrifiés pour analyse de l'activité myéloperoxidase au niveau de la patte. Ce protocole permet de prédire les activités anti-inflammatoires des produits in vivo.

Pour tous ces tests, le nombre minimum d'animaux par groupe est appliqué, de manière à avoir une expression satisfaisante des résultats en fonction de la variabilité individuelle, sans avoir à répéter l'expérience. Ces études sont faites après des études in vitro permettant de limiter le nombre de molécules à tester et donc le nombre d'animaux à utiliser. Ces essais ne peuvent pas être remplacés par des tests in vitro substitutifs et sont impératifs pour mener à bien le développement non-clinique de produits.

596- Écouter dans des situations réalistes est un processus actif qui mobilise les facultés perceptives et cognitives, conférant au discours du sens, à la musique sa capacité à susciter des émotions et aux sons de l'environnement de la pertinence. Grâce à l'écoute, les humains et les autres animaux naviguent à travers des scènes acoustiques complexes, séparent des sources sonores mélangés, désambigüisent des messages et évaluent leur pertinence comportementale. Ces prouesses remarquables sont actuellement au-delà de notre compréhension et dépassent de loin les capacités des systèmes d'ingénierie audio les plus sophistiqués. L'objectif du projet de recherche est d'étudier expérimentalement une approche radicalement nouvelle de l'audition, où l'écoute active émerge d'une profonde interaction entre les processus sensoriels adaptatifs et la cognition décisionnelle. Notre objectif est d'intégrer la fonction cognitive comme faisant partie intégrante du traitement sensoriel, ce qui se prête à une investigation neurophysiologique. Plus précisément, nous allons explorer le postulat que la perception active est médiée par un processus d'adaptation rapide au niveau neuronal (ici appelée plasticité rapide). A la confluence du traitement sensoriel et cognitif, la plasticité rapide se retrouve à tous les niveaux du système auditif, de la cochlée jusqu'au cortex auditif et préfrontal. Le projet s'appuie sur les travaux réalisés, lors de la dernière décennie, par le chercheur en charge du protocole sur la physiologie et la modélisation informatique de ces phénomènes. Ces efforts ont abouti à la découverte de plasticité rapide dans les neurones du cortex auditif. Ils ont aussi conduit à l'élaboration d'un modèle neuromimétique de traitement auditif qui ont mené à des percées technologiques et à des applications concrètes. Le projet permettra également d'intégrer de nouveaux paradigmes psychophysiques puissants pour sonder l'écoute active chez l'homme. S'appuyant sur ces domaines très complémentaires et

plusieurs innovations techniques (reconstruction de stimulus à partir d'enregistrements de neurones à grande échelle chez les animaux réalisant une tâche de comportement), nous espérons promouvoir une vision nouvelle de la perception auditive et de la cognition. Cela contribuera également de manière significative à des avancées significatives dans le domaine du traitement du signal pour les prothèses auditives cliniques, étant donné que de nombreuses limitations actuelles ne sont pas technologiques, mais plutôt conceptuel. Le projet répond à trois objectifs spécifiques à travers des projets expérimentaux qui intègrent de nombreuses méthodologies, principalement la psychoacoustique, la physiologie du comportement, des modèles informatiques et leurs applications : (1) explorer le rôle de la plasticité rapide dans la perception des stimuli ambigus, ainsi que (2) les bases physiologiques de la formation d'un motif et la cohérence d'un stimulus, (3) et leur mise en contexte en exploitant les modèles spectrotemporaux de la parole et de la musique. Afin de mieux comprendre les circuits neuronaux qui sous-tendent ces mécanismes physiologiques, nous réaliserons en parallèle des analyses histologiques sur un sous-ensemble des animaux. Toutes ces expériences doivent tirer parti au maximum de notre capacité à réaliser des enregistrements dans des animaux réalisant une tâche de comportement, durant laquelle les fonctions cognitives sont actives et exprimées dans les réponses neurales dans le cerveau. Nous avons mis un grand soin dans le respect des principes suivants :

Réduction : Au total, nous avons prévu d'utiliser 30 furets. De plus certains animaux seront aussi utilisés dans le cadre d'études d'anatomie en parallèle, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies en jouets et tunnels divers. Ils sont régulièrement mis tous ensembles dans une aire de jeu. Enfin durant les week-ends, les animaux ne doivent pas effectuer la tâche comportementale. Leur état de santé est suivi en permanence en collaboration avec un vétérinaire.

597- Le cancer du sein triple-négatif est un sous-groupe du cancer du sein agressif dont les patientes atteintes ne bénéficient à l'heure actuelle d'aucune thérapie anti-cancéreuse ciblée. Pour ces raisons, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est donc primordiale. Nous avons identifié des cibles d'intérêt dans les tumeurs triple-négatives. Leurs déplétions dans les cellules cancéreuses humaines triple-négatives induisent une diminution de la viabilité de ces cellules. La déplétion pour une de nos cibles dans les cellules injectées dans les souris immunodéficientes permettrait de confirmer la conséquence de l'absence de cette cible dans l'inhibition du développement des tumeurs mammaires triple négatives.

Le nombre de souris pour l'ensemble des expériences est de 60.

Les contraintes imposées aux animaux pour ces expériences sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

598- Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon. A des stades avancés de la maladie, les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité.

Une nouvelle classe de protéines, les récepteurs à dépendance, a été mise en évidence. Dans les cellules normales Ces récepteurs induisent une voie de mort cellulaire. Les cellules tumorales ont acquis la capacité d'échapper à cette mort en sécrétant notamment des molécules dit ligands, capables de se fixer sur ces récepteurs. Dans les cancers de l'ovaire, une expression anormalement élevée de ligand a été détecté dans les stades avancés de la maladie.

Nous avons établi des modèles de xénogreffes de tumeur de l'ovaire, obtenus directement à partir des fragments de tumeurs de patients implantées sur les souris immunodéprimées. L'expression des récepteurs à dépendance et leurs ligands a été mise en évidence dans ces modèles.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet antitumoral des nouvelles thérapies ciblées visant à empêcher la fixation du ligand sur son récepteur et ainsi rétablir la mort cellulaire et par conséquent la régression tumorale.

Expérimentation

Etude de toxicité : La première étape de l'expérimentation consiste à vérifier l'absence de toxicité des 4 anticorps associés à la chimiothérapie. Pour cette étape le nombre de souris nécessaire est de 60 souris immunodéprimées.

Etude d'efficacité : La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité de l'anticorps sur les xénogreffes obtenues à partir des tumeurs ovariennes humaines. Le nombre de souris pour les expériences d'efficacité est de 1680.

Des prélèvements du sang sont effectués dans les expériences d'efficacité sur 5 souris par groupe sous anesthésie générale.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

599- Le projet BILIKIMO vise à développer des modèles biomécaniques des tissus biologiques tels que le foie et le rein initialement du porc et ensuite de l'homme afin de pouvoir modéliser numériquement les organes. Le but de cette modélisation est d'obtenir un clone numérique patient-spécifique sur lequel le chirurgien pourra effectuer de la « simulation » et de la « planification » préopératoires, ainsi que utiliser le clone du patient durant le geste opératoire comme outils de navigation dans le concept de « chirurgie guidée par les images ». Afin de développer le modèle biomécanique, il est nécessaire de connaître les propriétés intrinsèques du « matériau biologique » afin de définir la loi de comportement mécanique des organes considérés.

Cette définition de « loi de comportement » est considérée la pierre angulaire du développement d'outils pour l'exécution de gestes complexes en radiologie interventionnelle et chirurgie mini-invasive, tels que le traitement de tumeurs du foie par radiofréquence et/ou cryoablation. Dans ces cas la modélisation pourrait identifier le comportement du foie suite à l'insertion de l'aiguille et prédire les déformations et les déplacements de l'organe et de l'outil afin de réduire le risque de dommages collatéraux. La faisabilité de cette approche a été déjà en partie vérifiée dans un précédent projet. Néanmoins, le modèle produit n'est pas suffisamment robuste et précis pour une application médicale patient-spécifique à ce stade, par manque de données expérimentales pour la caractérisation du matériau et la validation du modèle, ce qui motive le présent projet.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Il n'y a pas de méthodes de remplacement. Le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car son anatomie splanchnique est similaire à celle de l'Homme et les données obtenues préalablement au laboratoire montrent que les caractéristiques mécaniques des organes parenchymateux semblent être extrapolables à l'Homme.

Réduction : l'étude BILIKIMO sera déclinée en 2 phases nécessitant l'utilisation de 16 sujets expérimentaux au total. Durant la phase 1 les 16 cochons bénéficieront d'une imagerie de la région thoraco-abdomino-pelvienne par CT SCAN et Résonance Magnétique. Les mêmes animaux, quelques jours après la réalisation des images seront soumis à la phase 2 durant laquelle des tests mini-invasifs et invasifs seront effectués. Il n'y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori. L'utilisation de 16 cochons (dont chaque cochon est son propre témoin) devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants, sur la base aussi des résultats précédents du laboratoire.

Raffinement : l'étude BILIKIMO prévoit une phase 1 durant laquelle l'animal aura uniquement des imageries (CT SCAN et IRM) sous anesthésie générale sans aucun geste invasif associé. Durant la phase 2, également réalisée sous anesthésie générale, il n'y aura pas de survie du sujet expérimental.

600- Notre projet de recherches s'intéresse à la structure et au fonctionnement du système moteur (Cerveau, moelle épinière et muscles) dans des conditions normales et pathologiques. En étroite collaboration avec les cliniciens, des maladies neurodégénératives gravissimes humaines, spécifiques de ce système, telles que les amyotrophies spinales (SMA) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), sont étudiées dans leurs mécanismes fondamentaux afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous utilisons des souris (910 animaux sur 5 ans), qui ont été génétiquement modifiées et qui sont commercialisées en tant que modèles reconnus de ces maladies, ou dans lesquelles des molécules potentiellement impliqués dans ces maladies sont manipulées. Nous utilisons aussi des amphibiens *Xenopus laevis* (200 sur 5 ans) qui nous permettent des analyses aisées du développement embryonnaire. Notre objectif principal est d'identifier de nouvelles molécules qui pourraient devenir des médicaments pour alléger les symptômes de ces terribles maladies. Un savoir-faire unique développé au sein de notre équipe nous permet d'atteindre cet objectif grâce à une modulation d'activité musculaire par l'exercice physique. Nous allons donc soumettre le modèle souris génétiquement modifiée pour l'étude de la SMA et de la SLA à des protocoles d'exercice de course ou de natation, et nous identifierons, grâce à des techniques de biologie moléculaire, les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de l'exercice. Une fois identifiées et testées in vitro sur des cellules en culture de patients, seules les molécules qui montrent des effets positifs sur cellules pourront être testées in vivo, sur les modèles souris génétiquement modifiées pour l'étude de la SMA et de la SLA. Après injection, les effets du traitement seront analysés au niveau comportemental (durée de vie, comportement moteur), au niveau physiologique (électrocardiogramme, électromyogramme, électroencéphalogramme) et aux niveaux cellulaire et moléculaire. Nous analyserons aussi des souris génétiquement modifiées pour l'expression d'un gène dont l'implication dans les symptômes de la SMA ou de la



SLA est suspectée. L'implication de ces molécules pourra en outre être évaluée après croisement des modèles souris génétiquement modifiées pour l'étude de la SMA ou de la SLA avec des souris génétiquement modifiées pour l'expression du gène codant les molécules incriminées. Nous avons également montré que les paramètres et la nature de l'exercice, course ou natation, intense ou modérée, modulaient son efficacité dans ces maladies. Nous chercherons donc à mieux caractériser les protocoles d'exercice chez la souris, notamment par des approches physiologiques, afin d'être en mesure de proposer des protocoles de réhabilitation efficace pour les patients. Au niveau fondamental, nos résultats ont indiqué des perturbations du développement musculaire, que nous étudierons à l'aide du modèle amphibien *Xenopus laevis* et de plusieurs modèles souris présentant une altération de l'expression de protéines clés contrôlant la taille et le nombre des fibres musculaires.