



**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 (1)

1- Des données sur l'efficacité et la palatabilité des produits rodenticides sont requises pour toute demande d'autorisation des produits conformément à la directive concernant les produits biocides (DBP) (98/8/EC) et les notes techniques d'orientation sur l'évaluation des rodenticides.

Le but des essais d'alimentation avec choix de l'appât chez le rongeur (rat, souris) est de déterminer la palatabilité du produit pour l'animal. Dans ce test, les animaux ont le choix entre une source de nourriture non empoisonnée et l'appât contenant la substance active. La quantité d'appât consommée, dans lequel la substance active est incorporée, ou la mortalité des rongeurs est une mesure de la palatabilité de l'appât. En général chaque test sera effectué sur 10 rongeurs.

2- L'ensemble de ces recherches vise à mieux connaître et éventuellement remédier aux détériorations auditives qui affectent l'homme: surdité, acouphène, hyperacousie. Les processus physiopathologiques sous-jacents à ces pathologies auditives sont mal connus et en conséquence les possibilités d'y remédier sont très insuffisantes. Pour progresser dans cette perspective des expérimentations animales sont indispensables.

Nos études portent sur des modèles animaux (rongeurs) de différentes pathologies auditives observées chez l'homme et induisant surdité, acouphène et hyperacousie.

Nos travaux combinent des approches électrophysiologiques, comportementales, pharmacologiques et histologiques afin de disposer d'une compréhension intégrée des processus physiopathologiques. Nos recherches et analyses sont réalisées tant au niveau de physiologie cellulaire qu'au niveau de la physiologie des organes et structures auditives (oreille et cerveau). Les détériorations auditives étudiées chez l'animal sont induites par les mêmes causes que chez l'homme (traumatisme sonore, ototoxicité médicamenteuse, presbyacousie, ...). Des études sont bien sûr réalisées aussi chez des animaux contrôles qui servent de référence et permettent de mieux connaître les processus physiologiques normaux du fonctionnement auditif.

Les animaux utilisés sont des rongeurs (cobayes, rats, souris) pour lesquels des données scientifiques du système auditif sont bien établies. Le nombre d'animaux prévus est d'environ une centaine par an pour les cobayes, une cinquantaine par an pour les rats et une cinquantaine par an pour les souris. Comme chez l'homme on observe chez l'animal une grande variabilité individuelle de vulnérabilité aux conditions adverses produisant des pathologies auditives. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés des expériences préliminaires sont réalisées sur un nombre restreint d'animaux puis selon les résultats le nombre d'animaux d'étude est éventuellement augmenté lorsqu'un effet semble exister mais n'est pas suffisamment manifeste. Une partie importante des études est faite en études chroniques employant les mêmes animaux ce qui permet à la fois de réduire le nombre d'animaux et de supprimer partiellement la variabilité individuelle puisque chaque animal est son propre contrôle.

3- L'antibiorésistance est un problème majeur de santé publique, impacté à la fois par les usages médicaux et vétérinaires des antibiotiques. La majeure partie de la consommation vétérinaire se concentre sur les animaux d'élevage et en particulier la filière porcine. Dans ces élevages, l'antibiothérapie est pratiquée selon des modalités qui visent à traiter les animaux malades et à prévenir l'extension d'une infection à tous les animaux d'un groupe: l'usage curatif s'adresse aux animaux cliniquement atteints, les usages prophylactiques et métaphylactiques visent à prévenir le déclenchement ou la propagation des infections. La métaphylaxie correspond à l'administration d'un antibiotique à tous les animaux d'un groupe dès qu'un certain pourcentage d'individus (10%) est cliniquement atteint. Cette pratique est controversée, car il lui est reproché d'induire une surconsommation des antibiotiques favorisant l'émergence de résistances. La justification de la métaphylaxie repose sur l'hypothèse que tous les individus du groupe sont déjà infectés au moment de l'intervention et qu'il est plus favorable de traiter au cours de la phase d'incubation avant que les symptômes de la maladie ne se manifestent. Cette période se distingue de la phase clinique par le statut physiopathologique des animaux et au niveau de la population bactérienne cible.

- L'évolution clinique de l'infection aura un impact sur les capacités de défense de l'organisme, sur la consommation alimentaire (anorexie associée au syndrome fébrile) et donc sur la dose ingérée, et sur l'exposition de l'animal à l'antibiotique pour une dose donnée car la pharmacocinétique des médicaments peut être modifiée par la fièvre.

- Le moment du traitement au cours de l'évolution de l'infection conditionne la taille de la charge bactérienne du site infectieux (inoculum) ciblée par l'antibiotique

Ces facteurs peuvent être impliqués dans la variabilité interindividuelle des réponses aux antibiotiques. En particulier, une sous-exposition d'une fraction des animaux traités peut conduire au développement de résistances.

Notre hypothèse de travail est que la stratégie métaphylactique pourrait se révéler en fait plus favorable en termes d'usage prudent des antibiotiques qu'un traitement curatif, compte-tenu de la précocité de l'intervention post-contamination.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité d'un nouveau type de traitement métaphylactique à la ceftiofur sur un modèle porcin d'infection pulmonaire déjà maîtrisé au laboratoire. Nous nous attacherons également à évaluer l'impact de ce type de traitement sur le microbiote intestinal des animaux. Le but de ces expérimentations est de déterminer si à terme, l'utilisation de ce nouveau type de traitement pourrait être transposée sur le terrain.

4- En France, 5 à 10 % des couples rencontrent des difficultés pour accéder à une grossesse tant désirée.

Dans plus d'un tiers des cas, l'infertilité masculine est à l'origine de ce problème. Dans la majorité des cas d'infertilité masculine sont dus à une absence complète de la formation de spermatozoïde (Azoospermie) due à un dysfonctionnement du processus de différenciation de la lignée germinale. La lignée de cellules germinales assure la création de nouveaux individus dans la plupart des organismes multicellulaires, perpétuant les renseignements génétiques et épigénétiques à travers les générations. En conséquence, la reconstitution *in vitro* de cellules germinales est un des défis les plus fondamentaux en biologie.

Nous proposons sur la base de travaux récents de recréer la lignée germinale à partir de greffe de cellules-souches de la muqueuse olfactive dans le testicule.

5- Ce projet a pour but de tester l'efficacité d'ingrédients alimentaires d'origine végétale sur le développement de maladies nutritionnellement induites telles que l'obésité (induite par un régime hyperlipidique), l'hypercholestérolémie (induite par un régime hypercholestérolémique), le prédiabète (induit par un régime riche en fructose ou en lipide) ou l'inflammation colique légère (induite par un régime hyperprotéique).

Les différents ingrédients à tester sont choisis en fonction de la thématique (fibres solubles et/ou non-solubles dans le cas du prédiabète ...). Les doses et les temps d'administration sont choisis en fonction de la littérature, par exemple, huit semaines de supplémentation à 5 ou 10% dans l'aliment pour voir l'effet d'ingrédients sur le développement de l'hypercholestérolémie.

Les effectifs sont fixés de 10 à 12 animaux par groupe. D'après la littérature, les réponses à ce genre de traitement face à une maladie nutritionnellement induite est une modulation de 20% du biomarqueur choisi comme critère principal d'étude (cholestérol total dans le cas de l'hypercholestérolémie, cytokine de l'inflammation au niveau de la muqueuse colique ou glycémie à jeun dans le cas de l'étude du développement du prédiabète). L'effectif de chaque groupe a donc été calculé pour assurer, dans la mesure du possible, la significativité statistique et pour limiter le nombre d'animaux utilisés. L'impact physiologique d'un dérèglement nutritionnel est donc étudié au travers de ce projet, aucune technique de remplacement n'est donc possible.

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre de démontrer l'efficacité de certains ingrédients alimentaires dans le cadre de la prévention ou de la réduction de biomarqueurs symptomatiques de maladies ayant des origines nutritionnelles. Dans la plupart des cas, il s'agira de tester l'efficacité de nos ingrédients par rapport à ce qui a été publié sur une gamme de macro-ou micronutriments (notre fibre versus « les fibres » en général). Ce projet préclinique sur animal nous permettra de cribler l'efficacité ainsi que les doses efficaces de certains de nos ingrédients avant de d'envisager le stade clinique nécessaire à la construction d'un dossier EFSA pour l'obtention d'une allégation santé.

6- L'obtention de sérums immuns dirigés contre des cibles de cellules humaines est utile en thérapeutique humaine en vue de prévenir les rejets de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte en greffe de moelle. Ces sérums, appelés sérums anti lymphocytaires sont générés en immunisant des lapins contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets). Le coût de ces produits est important et l'utilisation de porc au lieu du lapin pourrait permettre une diminution de ce coût, compte tenu du rapport de poids des animaux et du fait qu'il est concevable de réaliser des prélèvements sanguins itératifs sans nécessité de sacrifice d'animaux.

Dans ce sens, les expériences présentées ici représentent une étape préliminaire. Elles visent à comparer la réponse immunitaire du porc et du lapin, dans le but de valider l'éventuelle utilisation alternative du porc. Un préalable consiste à s'assurer que le porc immunisé dans un protocole identique développe une réponse anticorps cytotoxique (IgG) sensiblement équivalente à celle du lapin. Ces expériences ne peuvent pas être conduites *in vitro*.

Plan expérimental: Nous comparerons la réponse de cinq lapins à celle de quatre porcs à un même protocole d'immunisation. Ce projet commun fait l'objet de deux saisines différentes: une pour le protocole réalisé chez le lapin (la présente) et une seconde pour le protocole réalisé chez le porc.

7- L'obtention de sérums immuns dirigés contre des cibles de cellules humaines est utile en thérapeutique humaine en vue de prévenir les rejets de greffe ou la réaction du greffon contre l'hôte en greffe de moelle. Ces sérums, appelés sérums anti lymphocytaires sont générés en immunisant des lapins contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets). Le coût de ces produits est important et l'utilisation de porc au lieu du lapin pourrait permettre une diminution de ce coût, compte tenu du rapport de poids des animaux et du fait qu'il est concevable de réaliser des prélèvements sanguins itératifs sans nécessité de sacrifice d'animaux.

Dans ce sens, les expériences présentées ici représentent une étape préliminaire. Elles visent à comparer la réponse immunitaire du porc et du lapin, dans le but de valider l'éventuelle utilisation alternative du porc. Un préalable consiste à s'assurer que le porc immunisé dans un protocole identique développe une réponse anticorps cytotoxique (IgG) sensiblement équivalente à celle du lapin. Ces expériences ne peuvent pas être conduites *in vitro*.

Plan expérimental: Nous comparerons la réponse de cinq lapins à celle de quatre porcs à un même protocole d'immunisation. Ce projet commun fait l'objet de deux saisines différentes: une pour le protocole réalisé chez le lapin et une seconde pour le protocole réalisé chez le porc (la présente).

8- L'alimentation des canards producteurs de foie gras représente plus de 60% des coûts d'élevage. Par comparaison à d'autres filières avicoles, les canards, et particulièrement le canard mulard (hybride stérile d'une cane commune et d'un canard de Barbarie), présentent de mauvais indices de consommation en élevage (>3,4). Ce mauvais rendement de transformation de l'aliment ingéré conduit à une utilisation excessive de l'aliment et à des rejets importants, ce qui représente un surcoût économique mais aussi un impact sur l'environnement.

De façon à améliorer ce rendement alimentaire, une expérience de sélection génétique sur un critère d'efficacité alimentaire a débuté en canard en 2009. L'objectif de ce projet était de sélectionner des canards de Barbaries sur l'efficacité alimentaire de leurs fils mulards. Le critère de sélection retenu est la consommation résiduelle (CR), qui correspond à la consommation alimentaire totale corrigée pour les besoins d'entretien, de croissance et d'engraissement. Seize pères Barbaries «extrêmes» ont été sélectionnés à chaque génération de sélection. Deux générations de sélection ont été réalisées et deux lignées divergentes produites: une lignée «haute» (CR élevée) et une lignée «basse» (CR faible).

Depuis fin 2011, nous disposons d'un Système d'Enregistrement Automatique du Comportement Alimentaire des Palmipèdes (SEACAP) opérationnel, permettant la mesure de l'ingestion, du comportement alimentaire individuel et du poids de canards élevés en lot. Dans le cadre de l'expérience de sélection précédente, nous n'avions pas accès à ces données individuelles de consommation alimentaire. Grâce à cet outil, nous allons pouvoir caractériser la divergence génétique obtenue en termes de comportement alimentaire individuel, et étudier les liens entre comportement alimentaire en phase de croissance et qualité des produits après le gavage.

Pour cela, dans le cadre du projet EFFIDUCK, un lot de 80 canards mulards et un lot de 80 canards de Barbaries issus des mêmes pères «extrêmes» de la dernière génération de sélection vont être étudiés grâce à l'outil SEACAP. Ceci permettra de caractériser l'impact de la sélection divergente sur la consommation alimentaire, la vitesse d'ingestion, l'état d'engraissement des animaux. Les deux lots d'animaux seront également gavés et abattus dans les conditions d'un élevage conventionnel afin d'étudier le lien entre vitesse d'ingestion en phase de croissance et aptitude au gavage.

En parallèle de cette étude de la consommation alimentaire, nous souhaitons également explorer la consommation en eau des animaux. Cette consommation étant étroitement liée à la consommation d'aliments, il serait intéressant de prendre en compte l'abreuvement dans la modélisation des repas des animaux.

D'autre part, la sélection sur la consommation résiduelle peut engendrer d'autres réponses, notamment sur la réactivité au stress. A la fin de la période de croissance des animaux, nous souhaitons donc caractériser la réactivité au stress de l'ensemble des canards afin de mesurer l'impact de la sélection divergente sur ces caractères.

9- L'implantation d'un dispositif médical chez l'homme peut entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation. Ces réactions peuvent aller des dégradations importantes des tissus environnants et nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves.

Par obligation réglementaire et en l'absence de méthodes alternatives, l'utilisation d'animaux est indispensable pour tester les dispositifs médicaux avant implantation chez l'homme.

Le lapin est alors l'un des modèles privilégiés pour mener ces évaluations. Le nombre d'animaux utilisés est basé sur les recommandations textes de référence (ex: norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques.

Les procédures menées se font sous anesthésie générale et un traitement analgésique approprié est mis en place pour contrôler la douleur. Par ailleurs, tous les animaux bénéficient d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des études. Des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles sont assurés entre congénères ; des chaînettes peuvent être suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes peuvent être disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent; enfin, de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

10- Des mutations dans le gène *Mecp2* provoquent plusieurs maladies neurologiques dans l'espèce humaine, dont le syndrome de Rett (RTT). Un déficit des catécholamines (dopamine, noradrénaline ...) pourraient jouer un rôle clé dans la physiopathologie de ces maladies. Il existe un lien entre les déficits catécholaminergiques dans le système nerveux central des souris déficientes pour *Mecp2* et certains signes cliniques présentés par ces animaux modèles. Le principal objectif de ce projet sera d'identifier la part du phénotype des souris *Mecp2*-déficientes liée aux déficits en tyrosine hydroxylase (l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines). La souris est le meilleur modèle disponible pour modéliser les déficits induits chez un mammifère par la déficience du gène *Mecp2*. Il n'existe aucun autre modèle.

Ces modèles ont déjà été utilisés pour des projets de recherche fondamentale et/ou pour des projets de recherche translationnelle ayant abouti à des essais cliniques. Le projet utilisera des animaux transgéniques exprimant *Mecp2* sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase avec un effectif total estimé à 360 individus, nombre calculé pour fournir des résultats statistiquement significatifs tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés. A terme, ce projet devrait permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques qui pourront être utilisées dans l'espèce humaine.

11- Une approche unique: l'immunisation active anti-cytokine

Les cytokines sont des protéines naturelles qui assurent la communication intercellulaire et orchestrent les réponses immunitaires et inflammatoires. La surexpression des cytokines a été identifiée comme l'une des causes de l'apparition ou du développement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses.

Les médicaments, et en particulier les immunothérapies passives telles que les anticorps monoclonaux, qui bloquent l'activité d'une cytokine cible, ont récemment fait leurs preuves dans le traitement de ces pathologies. Par exemple, les produits bloquant le TNF α ont un impact majeur sur le traitement de maladies auto-immunes inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), la maladie de Crohn (CD) ou encore le psoriasis.

Cependant, les approches actuelles souffrent de certaines limites: les anticorps monoclonaux ne ciblent qu'un seul épitope et ne sont pas toujours efficaces pour des cibles variables ou existantes naturellement sous forme de multiples sous-types.

L'administration de protéines 'étrangères' peut générer une résistance amenant une perte d'efficacité et d'éventuels effets secondaires. Ces médicaments sont onéreux, ce qui pose des problèmes d'accessibilité, tant pour les organismes de santé que pour les patients; ils requièrent des injections fréquentes donc contraignantes, et enfin sont susceptibles de supprimer l'activité bénéfique de la cytokine-cible sur les tissus sains.

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie active reposant sur la production, par le système immunitaire du patient, d'anticorps anti-cytokine après administration d'un candidat vaccin, a été développée.

Cette administration est réalisée sous forme d'émulsion avec un adjuvant huileux (ISA51vg) qui induit une réponse naturelle d'anticorps polyclonaux spécifique de la cytokine-cible, capable de neutraliser son activité pathologique.

Expérimentation animale

L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire (réponse humorale) ne pouvant s'effectuer que sur animaux vivants, les produits sont d'abord testés sur 30 souris consanguines (orientées réponse humorale - Production d'anticorps) afin de valider l'apparition et la disparition des « autos anticorps » générés au cours du protocole d'immunisation par le candidat vaccin. Les conditions d'un protocole de libération de lot pour lequel un nombre de 10 animaux par groupe procurera une puissance statistique satisfaisante.

Les souris sont injectées 3 fois au maximum et plusieurs prélèvements de sang sont effectués. Pour évaluer la réponse immunologique des ELISA et des tests de capacité neutralisante des anticorps induits sont réalisés.

Les contraintes imposées à l'animal sont très modérées. Les injections intramusculaires et les prélèvements au sinus retro-orbital n'induisent pas de modification de leur bien-être. Seul le stress de la contention impacte brièvement leur comportement. Ici nous souhaitons évaluer une nouvelle méthode de préparation de l'émulsion en la comparant à celle utilisée jusqu'alors. Cette validation permettra d'implémenter cette technique dans les prochains protocoles clinique, rendant plus aisée et plus reproductible la préparation du vaccin.

12- L'objectif de ce projet est de vérifier l'innocuité (vérification de la non toxicité) ou le comportement (pharmacodynamique, pharmacocinétique, ou comment le produit est utilisé et éliminé) de molécules tests chez un organisme vivant (le rat, la souris ou le cobaye). Ces molécules tests ont été sélectionnées par des chercheurs et font l'objet de premières analyses chez l'animal de laboratoire avant de pouvoir être testées chez l'homme ou l'animal de compagnie et éventuellement de devenir des médicaments pour l'homme ou l'animal. Le bénéfice pour les êtres humains et/ou les animaux est la possibilité de sélectionner des molécules n'étant pas toxiques et/ou ayant des propriétés intéressantes.

Pour ce projet, 200 à 3000 rats ou souris pourront être utilisés dans les 5 ans à venir (le nombre d'animaux est très variable car dépendant du nombre de molécules intéressantes identifiées lors des projets de recherche).

Si une molécule test est toxique, les rats, les souris ou les cobayes à qui cette molécule est administrée pourront être malades. Dans le cadre des procédures, les animaux sont observés tous les jours. Les animaux malades sont identifiés et un vétérinaire vient les observer, pour décider de l'administration de traitements, ou, dans les cas où les problèmes sont graves et incurables, effectuer l'euthanasie des animaux selon des méthodes qui sont acceptées et reconnues.

Pour ce type de procédure, il est essentiel d'administrer les molécules tests à des organismes vivants complexes comme le rat ou la souris car le devenir de ces molécules dépend de l'action et de l'interaction d'un grand nombre d'organes (les reins, le foie, le cerveau par exemple).

Le nombre d'animaux choisis pour ces procédures est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs. En général, par groupe de traitement 5 à 20 animaux au maximum sont utilisés. Le nombre précis est choisi grâce à des outils statistiques.

Le rat, la souris et les cobayes sont des animaux utilisés dans le cadre de ce type d'analyse depuis de nombreuses années. Ce sont des mammifères dont l'anatomie et la physiologie sont proches des hommes et des animaux domestiques, ce qui permet d'obtenir des informations fiables et pertinentes. La disponibilité de très nombreuses données historiques chez ces deux espèces pour ce type de procédure permet d'analyser les données obtenues pour de nouvelles molécules avec beaucoup de précision et de pertinence.

13- L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité de la combinaison de médicaments sur la prévention des conséquences de l'infarctus du myocarde. Les combinaisons de médicaments vont être testées chez des souris chez lesquelles un infarctus du myocarde aura été induit par intervention microchirurgicale. L'infarctus du myocarde reste l'une des causes de mortalité principale dans le monde occidental. Des traitements ont déjà été développés mais leur efficacité est limitée.

Une équipe de recherche a identifié que l'association de plusieurs traitements pourrait théoriquement être très bénéfique pour limiter les conséquences d'un infarctus et souhaite s'assurer que ce bénéfice est réel grâce à de premières études sur l'animal de laboratoire, avant la réalisation de test cliniques chez l'homme.

Pour ce projet, environ 500 souris seront utilisées dans les 5 ans à venir. Plusieurs étapes seront nécessaires pour sélectionner les combinaisons et les doses les plus prometteuses puis pour en évaluer les bénéfices.

Les souris seront opérées par une équipe de chirurgie experte en microchirurgie de l'animal de laboratoire et recevront des traitements pour soulager la douleur liée à l'intervention chirurgicale et à la présence de l'infarctus. Après la chirurgie, les souris peuvent mourir ou être très affectées par l'infarctus. Les souris montrant des signes de douleur ou de stress marqué malgré les traitements anti-douleurs seront prise en charge par un vétérinaire et immédiatement euthanasiées si nécessaire.

Les souris ont été choisies comme modèle car les conséquences d'un infarctus du myocarde sur l'état de santé des personnes atteintes sont très complexes et ne peuvent être évaluées que sur un être vivant dont l'anatomie et la physiologie cardiovasculaires sont proches de celle de l'homme.

Le nombre d'animaux choisis pour les procédures de ce projet sera réduit au minimum à l'aide d'outils statistiques.

Le modèle souris avec un infarctus du myocarde induit par microchirurgie est très bien décrit dans la littérature scientifique, il est utilisé depuis les années 1960 pour évaluer l'efficacité de nouveaux traitements ou pour analyser les conséquences des infarctus.

14- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client de la société demandeuse, qui développe des composés à visée commerciale dans le domaine du bien-être en gastroentérologie.

Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer les effets bénéfiques d'un composé X (la dénomination du composé est sujette à accord de confidentialité) sur le temps de transit total ainsi que sur la fréquence d'émission et la qualité des fèces chez le rat sauvage, en conditions basales et de constipation expérimentalement induite, et de comparer ces effets à ceux d'un composé de référence. A terme, les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société cliente de commercialiser un composé traitant un mauvais état de santé ou d'autres anomalies chez l'homme dans le domaine de la gastroentérologie.

L'étude consiste en une phase initiale de traitement chronique (16j) par un composé X (groupe expérimental), un composé de référence (groupe référence) ou le véhicule (groupe contrôle). Les 3 derniers jours de traitement, les animaux entrent dans une seconde phase expérimentale pendant laquelle sera déterminé l'impact des traitements sur la fonction digestive (temps de transit total, fréquence d'émission et degré d'hydratation des fèces). Pendant cette phase de 72h, deux conditions seront étudiées: conditions basales (modèle de rat sauvage) et condition de constipation expérimentalement induite"

Le projet est basé sur des procédures expérimentales peu invasives (voire non invasives) et le niveau de souffrance qui en résulte est par conséquent léger voire nul.

L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de la fonction digestive et de la qualité des fèces produites après un traitement chronique.

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

Un total de 90 rats Wistar sera utilisé, divisé en groupes de 15 animaux pour chaque condition expérimentale (trois traitements différents: Composé X, composé de référence et véhicule - Deux conditions expérimentales différentes: conditions basales vs. constipation expérimentalement induite). Le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé par une équipe de biostatisticiens à partir des résultats obtenus lors d'une étude pilote menée sur 15 animaux. Le nombre de 15 animaux par groupe a été défini comme le nombre minimum d'animaux à utiliser dans l'étude pour pouvoir mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les différents paramètres étudiés.

15- La thérapie photodynamique (POT) est une modalité de traitement des petites tumeurs localisées accessibles à la lumière. Son principe repose sur l'action conjuguée d'un photosensibilisateur (PS), de la lumière et de l'oxygène, aboutissant à la production d'espèces réactives d'oxygène (EROs) cytotoxiques. Malheureusement, un problème majeur de la thérapie photodynamique réside dans la sélectivité modérée du PS (mTHPC) pour les cellules cancéreuses, ce qui impose d'utiliser des concentrations importantes de mTHPC dans les protocoles cliniques, entraînant de sérieux effets secondaires. Pour pallier ces problèmes, l'utilisation de mTHPC encapsulé dans des liposomes (Foslip®) a été envisagée afin d'améliorer leur rétention dans les tissus malins. Néanmoins, une photosensibilité cutanée persistante est toujours observée. C'est pourquoi, l'utilisation d'antioxydants a été envisagée. Les antioxydants (AOs) sont des composés qui, dans des conditions normales, inhibent la peroxydation lipidique mais, sous certaines conditions, peuvent agir comme des pro-oxydants. Ceci pourrait permettre un traitement efficace tout en diminuant la photosensibilité cutanée.

Le but de ce projet est donc de déterminer l'effet de 2 antioxydants (Secoisolariciresinol, SECO et Oihydroquercétine, OHQ). La photosensibilité cutanée et l'effet tumoricide induit par la POT-Foslip®, en présence ou non d'AO, sera évaluée. Au vu des expériences sur cellules en culture, l'intérêt de tester la OHQ est son absence de toxicité vis à vis des cellules normales par rapport aux cellules cancéreuses. Quant au SECO, il ne semble pas cytotoxique mais améliore l'efficacité de la POT sur les cellules cancéreuses. L'administration intra-tumorale a été testée dans la littérature avec des résultats encourageants. Cependant, la voie orale est requise en clinique et donc intéressante à évaluer in vivo.

Pour ce faire, notre étude utilisera un modèle murin connu. Il s'agit de greffes sous cutanées de cellules d'adénocarcinome de colon humain (HT29). C'est un modèle de référence au laboratoire car moyennement sensible à la POT, ce qui permet une

appréciation de l'efficacité du traitement selon différentes modalités de traitement (un modèle trop sensible ou trop résistant est difficilement évaluable).

Les protocoles expérimentaux sur souris immunodéficientes impliquent:

- Xénogreffe de cellules d'adénocarcinome de colon humain (HT29)
- Injection intraveineuse du Foslip®
- Injection intra tumorale ou per os de l'AO testé
- Traitement POT
- Mesure de la taille des tumeurs
- Observation des effets cutanés
- Sacrifice (dislocation cervicale)

Résultats attendus:

- Retard de croissance tumorale
- Réduction (ou absence) de la photosensibilité cutanée

16- L'amyotrophie spinale (SMA) est une maladie caractérisée par la dégénérescence des motoneurons médullaires et par l'atrophie irréversible des muscles. Bien que la SMA représente une des causes génétiques de mort infantile les plus communes, aucun traitement curatif n'est disponible.

Les modèles rongeurs demeurent essentiels au développement de nouvelles approches thérapeutiques et à la compréhension des mécanismes pathogéniques. Toutefois, des modèles dits « gros animal », plus proches de l'homme que les rongeurs sont indispensables avant toute extrapolation à l'homme d'une stratégie thérapeutique.

Un modèle félin atteint d'une forme juvénile de dégénérescence des motoneurons associée à une délétion touchant le gène « limb-expression 1 » (Lix1) a été découvert en 2005 et représente le seul modèle gros animal de SMA disponible pour tester des stratégies thérapeutiques.

Notre équipe a identifié le virus adéno-associé de sérotype 9 (AAV9) comme un vecteur efficace pour la transduction des motoneurons de chats après injection intraveineuse. Une telle stratégie pourrait permettre d'apporter un facteur thérapeutique dans les motoneurons des patients SMA. Néanmoins, cette voie d'administration conduit à la présence du génome viral dans des organes périphériques non ciblés. Il apparaît essentiel de développer des administrations de vecteurs AAV9 plus localisées restreignant l'expression du facteur thérapeutique au système nerveux central (SNC). Nous avons récemment démontré qu'une injection intrathécale du vecteur AAV9 est une méthode efficace pour transduire des motoneurons chez le chat. Parallèlement, une autre voie d'administration s'est révélée intéressante pour cibler la moelle épinière: l'administration d'un vecteur AA V dans le cortex moteur et la capsule interne. En effet, ces deux structures cérébrales communiquent avec la moelle grâce à un large faisceau axonal : le faisceau cortico-spinal, ce qui en théorie peut permettre, après une seule injection de vecteur AA V, de cibler tous les étages de la moelle par transport antérograde des particules virales. Jusqu'à présent, cette voie d'administration a été testée chez le chat avec un vecteur AA VI qui est capable de transduire de nombreux neurones dans le cerveau des chats mais semble faiblement efficace dans la moelle lorsqu'il y est directement administré. Il serait particulièrement pertinent de tester cette voie d'administration avec un vecteur AA V9 qui présente un important tropisme pour les neurones médullaires.

Dans cet objectif, nous proposons d'injecter deux chatons sains (lix1+/-) issus des portées de chats lix1 par voie intracérébrale avec un vecteur AA V9 recombinant pour la "green fluorescent protein" (GFP)

Cette étude pourrait ainsi valider l'utilisation de vecteurs de type AA V9 par voie intracérébrale dans le cadre d'une stratégie thérapeutique des maladies du motoneurone ou pour des maladies neurodégénératives pour lesquelles une stratégie de thérapie génique dans l'ensemble du SNC pourrait être bénéfique.

17- La chirurgie de la thyroïde est le type le plus commun de chirurgie endocrinienne effectuée pour des pathologies bénignes et malignes. Cependant, cette chirurgie peut avoir des effets néfastes sur les patients. L'hypocalcémie est de loin la complication post-opératoire la plus fréquente après une chirurgie de la thyroïde. Le taux d'hypocalcémie temporaire varie de 2% à 50% et celui d'hypocalcémie permanente de 0,4% à 13,8%.

L'identification précoce des glandes parathyroïdes normales et/ou élargies aide à décider de l'étendue de la chirurgie et diminue l'occurrence d'une hypocalcémie postopératoire.

Le Bleu de méthylène (MB) est un colorant qui lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, est capté par la thyroïde et les tissus parathyroïdiens de manière différentielle. Il est actuellement utilisé pendant la chirurgie parathyroïdienne pour aider à la visualisation à « l'œil nu » des glandes parathyroïdes élargies.

Le Bleu de méthylène présente également la propriété d'émettre de la fluorescence dans le proche infrarouge qui peut être visualisée par un système d'imagerie approprié. L'utilisation de cette technique très sensible, permettrait l'injection de doses de bleu de méthylène très inférieures à celles actuellement administrées, ce qui rendrait la procédure plus sûre pour le patient. De plus, l'utilisation peropératoire de l'imagerie de fluorescence dans le proche infrarouge pour la détection du bleu de méthylène permettrait l'identification précoce des glandes parathyroïdes et donc l'amélioration du geste chirurgical au cours de la chirurgie de la thyroïde et des parathyroïdes.

L'objectif de ce projet est de comprendre le patron de la fluorescence émise par le Bleu de méthylène, détectée par un système d'imagerie approprié (Fluobeam®700), au niveau des structures des tissus mous du cou chez le lapin. Les résultats de ce projet seront utilisés pour développer un protocole clinique pour l'utilisation combinée du bleu de méthylène par voie intraveineuse et du Fluobeam®700 au cours de la chirurgie de la thyroïde et des parathyroïdes. Nous utiliserons 6 lapins, 3 lapins pour une phase

de mise au point technique (dose de bleu de méthylène optimale) et 3 lapins pour quantification de la fluorescence et visualisation optimale des glandes avec l'imagerie par fluorescence.

Les animaux seront hébergés dans l'établissement utilisateur 1 semaine avant l'intervention (hébergement conventionnel dans des cases adaptées, enrichissement par mise à disposition d'un bout de bois à ronger, granulés et eau à volonté). Les animaux sont transférés dans les locaux expérimentaux dans des cages de transport aux normes où ils restent à jeun en attente de l'anesthésie dans une salle chauffée et calme, isolée des salles d'intervention.

18- La naissance prématurée avant 33 semaines d'aménorrhée (SA) (terme normal de 38 à 40 SA) concerne 10000 naissances par an en France. L'évolution à long terme de ces enfants est conditionnée par leur pronostic neurologique. En effet, ils présentent des atteintes du développement psycho-moteur et cognitif associées à des anomalies de la substance blanche cérébrale définies sous le terme de leucoencéphalopathie du prématuré. Ces atteintes concerneraient environ 35% des enfants nés avant 33 SA. Le processus d'infection/inflammation est l'un des deux principaux facteurs de risque directement impliqués dans la physiopathologie de ces atteintes cérébrales. La mélatonine a montré une action neuroprotectrice dans le contexte de l'hypoxie-ischémie cérébrale. Notre objectif est d'étudier l'effet neuroprotecteur de la mélatonine, dans un modèle animal d'infection/inflammation maternofoetale, de la période anténatale à l'âge adulte et d'en évaluer l'innocuité sur le cerveau en développement.

A la naissance, le cerveau du rat est à un stade de développement similaire à celui d'un enfant né au cours du troisième trimestre de grossesse. Le modèle expérimental est celui d'une infection induite par une injection intra-péritonéale à G19 et G20 d'un fragment bactérien de lipopolysaccharides d'*Escherichia Coli* (LPS) chez des rates gestantes, modélisant le contexte d'une naissance prématurée au cours d'une infection maternelle chez l'Humain.

Il a été démontré précédemment que les rats nouveau-nés issus de ces portées présentaient alors une augmentation des marqueurs inflammatoires cérébraux et une atteinte de la substance blanche cérébrale à P7.

Par ailleurs, la mélatonine a déjà été étudiée dans ce modèle: des injections intra-péritonéales de mélatonine à G19 et G20 en association avec le LPS ou non ont été réalisées. Cela ne modifiait pas les caractéristiques des portées à la naissance (nombre de petits, poids à P1). En revanche, la réponse inflammatoire systémique (cytokines pro-inflammatoires sériques) chez la progéniture à P1 traitée par l'association LPS+ mélatonine était diminuée et l'effet sensibilisant du LPS au stress excitotoxique cérébral était neutralisé (stress induit par une injection intracrânienne d'iboténate à P4). Ainsi, la mélatonine semble permettre la neutralisation des effets mesurés à la période néonatale, probablement par une modulation de la réponse inflammatoire foetale et néonatale.

L'objectif du présent projet est de caractériser l'effet anti-inflammatoire de la mélatonine, administrée en anténatal, chez la mère et le fœtus et pendant la première semaine de vie de la progéniture (à P1 et P7).

Par ailleurs, nous induirons une lésion cérébrale chez les rats nouveau-nés à P4 pour rechercher un effet dose-dépendant de la mélatonine sur l'effet sensibilisant du LPS 4 jours plus tard (soit à P8).

Enfin, nous rechercherons un effet à long terme de la mélatonine sur le cerveau à l'âge adulte.

Pour cela, nous induirons une lésion cérébrale à l'âge adulte (au delà du 60ème jour de vie) et nous explorerons la neuroinflammation induite in vivo par imagerie cérébrale PET - scan et in vitro par autoradiographie.

Nous utiliserons pour ce projet 72 rats femelles gestantes et 300 à 500 rats nouveau-nés issus de leurs portées

19- L'élucidation des mécanismes contrôlant la reproduction saisonnée représente un challenge scientifique important, qui revêt une importance économique considérable. En effet, le besoin de fournir régulièrement au cours de l'année des produits laitiers et carnés des espèces hautement saisonnées (par exemple, les ovins et les caprins), associée à des régulations plus strictes en matière de l'utilisation d'hormones exogènes par l'Union Européenne des procédés d'élevage, nécessitent d'élaborer des méthodes de contrôle de la reproduction plus respectueuse de l'animal. La synchronisation de la reproduction saisonnée dépend principalement de facteurs environnementaux parmi lesquels la durée du jour (photopériode) est le plus important. Le contrôle central de la reproduction repose sur l'activité de neurones à gonadolibérine (GnRH) localisés dans une région du cerveau, l'aire préoptique, cependant des travaux antérieurs ont montré que l'information photopériodique est décodée en amont de ces neurones. L'hypothèse de travail développée dans ce projet est que des populations hypothalamiques spécifiques relaient l'information des signaux photopériodiques environnementaux à l'axe gonadotrope.

Notre objectif principal est d'identifier les peptides hypothalamiques qui montrent des modulations de leur contenu sous l'influence de la photopériode, d'analyser leurs distributions neuroanatomiques, et de déterminer leurs effets physiologiques sur l'activité de reproduction.

De plus, les espèces saisonnées répondent différemment aux signaux photopériodiques suivant la durée de leur gestation et sont classées en reproducteurs de jours courts (moutons) ou de jours longs (hamsters). Dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes centraux permettant une réponse physiologique opposée en réponse au même message photopériodique, nous proposons de réaliser nos travaux en parallèle chez la brebis et le hamster femelle. Cependant cette demande de saisine ne porte que sur l'espèce ovine étant donné que les travaux sur les hamsters seront réalisés à Strasbourg.

20- Le projet vise à élever en hébergement individuel des oiseaux domestiques adultes afin de pouvoir identifier au mieux leurs gamètes (cellules de reproduction) qui seront par la suite utilisés pour faire de la conservation de la diversité génétique dans le cadre de l'Infrastructure Nationale CRB-Anim. Une prise de sang sera réalisée sur chaque animal afin de conserver, en plus des gamètes, des échantillons de sang pour des études génomiques et aussi pour préserver la possibilité de rechercher ultérieurement le portage de maladies encore inconnues à l'heure actuelle.

Au plan scientifique, l'objectif du projet est d'assurer un complément de sécurisation de races/lignées par la constitution de banques génomiques et de cellules de reproduction.

Nous utiliserons 248 animaux adultes par espèce (hébergés au sol pour les dindes et les oies et hébergés en cages individuelles enrichies pour les poules et les pintades). En effet, 48 mâles est le nombre minimum permettant de tester avec une précision suffisante la qualité de la semence des mâles reproducteurs ayant des performances contrastées dans chaque espèce. 200 femelles sont nécessaires par espèce pour estimer le pouvoir fécondant de ces mâles.

21- La mucoviscidose est une maladie génétique de l'Homme caractérisée par une anomalie du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Chez les personnes atteintes, l'absence de gène CFTR fonctionnel se traduit par une augmentation de la viscosité du mucus dont l'accumulation dans les voies respiratoires et digestives entraîne des pathologies telles que bronchite et complications infectieuses pulmonaires, insuffisance pancréatique, obstruction digestive ... dont le traitement est aujourd'hui seulement palliatif et symptomatique. Ces affections limitent l'espérance de vie des patients à une quarantaine d'années seulement.

Pseudomonas aeruginosa (Pa) est un des agents pathogènes les plus fréquents des voies respiratoires des patients en situation de surinfection. Cette bactérie provoque le recrutement massif de polynucléaires neutrophiles qui sécrètent des protéases, enzymes qui lèsent le tissu pulmonaire et entraînent une insuffisance respiratoire sévère, cause majeure du décès des patients atteints de mucoviscidose.

Les poumons du porc présentent avec les poumons humains des similitudes anatomiques et physiologiques importantes qui en font un modèle de choix pour l'étude de phénomènes inflammatoires pulmonaires. Et une équipe américaine a récemment montré qu'un porc génétiquement déficient pour le gène CFTR développait des signes cliniques de mucoviscidose très semblables à ceux observés chez les patients humains. La mise en place d'un modèle identique est en cours, grâce à une collaboration avec un laboratoire qui a réussi également à générer un porc avec un gène CFTR invalidé. Un verrat et une truie hétérozygotes CFTR +/- ont été mis en reproduction pour produire des animaux homozygotes CFTR/- exprimant la maladie.

Des naissances d'animaux homozygotes sont prévues en 2013.

Mais l'expression de la maladie est précoce: les porcelets homozygotes CFTR/- présentent à la naissance un « ileus méconial », c'est-à-dire une obstruction de l'intestin par un méconium épais et visqueux, pouvant s'étendre de la moitié postérieure de l'intestin grêle jusqu'au colon. Cette obstruction est létale sans intervention et nécessite donc l'opération systématique des porcelets dans les premières heures de la vie, pour vider l'intestin et réaliser une iléostomie, c'est-à-dire un abouchement direct de la partie terminale de l'intestin grêle à l'extérieur (sorte d'anus artificiel). Des naissances, programmées en mai et septembre 2013 permettront de mettre au point non seulement les techniques chirurgicales, mais aussi le suivi postopératoire et le nursing (alimentation, conditions d'hébergement, traitements palliatifs ...) des nouveau-nés. La procédure impliquera un maximum de 40 porcelets, pour l'ensemble des mises-bas.

L'objectif de ce projet est donc de sauver les porcelets CFTR/- à la naissance et de les conduire jusqu'au sevrage, pour pouvoir étudier ensuite la pathologie pulmonaire (qui ne se manifeste qu'après quelques semaines), réaliser des infections expérimentales et tester de nouveaux traitements.

22- Ce projet est réalisé en prestation de service pour un groupe industriel finlandais. Ce groupe développe des aliments ou additifs pour vaches laitières, permettant d'augmenter la production laitière et le taux butyreux du lait.

L'objectif de cet essai vise à déterminer l'effet d'un additif X dans le cas d'une ration à base d'ensilage de maïs sur les performances laitières (production et composition du lait) et le métabolisme lipidique chez la vache laitière.

Nous travaillerons sur des vaches laitières Prim'Holstein primipares (environ 44%) et multipares (environ 56%) à un stade physiologique identique (=après le pic de lactation).

Nous comparerons 3 lots de 18 vaches laitières conduits en parallèle, soit 54 animaux

au total: 1 lot témoin recevant un concentré témoin (groupe A), un lot expérimental recevant un concentré avec l'additif X (groupe B), un lot expérimental recevant un concentré de même teneur en énergie et en azote que le groupe B mais sans additif (groupe C). Ces effectifs sont nécessaires et suffisants pour mettre en évidence des différences statistiquement valides.

En plus de l'enregistrement des paramètres zootechniques, des mesures seront effectuées sur prélèvements de sang, sur prélèvements de lait et sur prélèvements de tissu mammaire par biopsie.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation sur animal vivant pour ce type d'essai. Il n'existe pas non plus de méthodes alternatives aux biopsies de glande mammaire pour l'étude in vivo du métabolisme lipidique.

23- Le mélanome de la choroïde est la plus fréquente des tumeurs oculaires de l'adulte. Dans 50% des cas les patients développent des métastases pour la majorité sont situées 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.

Expérimentation

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.

Greffes et passages

Les xénogreffes de tumeurs de mélanome de la choroïde établies précédemment à partir de tumeurs de patientes sont greffées sur des souris femelles adulte.

Le nombre d'animaux greffés initialement est de 15 par groupe afin d'obtenir un nombre minimum de 10 souris dans tous les groupes, minimum indispensable pour pouvoir évaluer de façon statistique robuste l'effet des médicaments.

La greffe de la tumeur se fait sous anesthésie générale. Une incision est faite au niveau de la région scapulaire et un fragment de tumeur est placé sous la peau. L'ouverture est ensuite refermée à l'aide d'agrafes. Les souris sont identifiées par des trous effectués aux oreilles à l'aide d'un poinçon.

Croissance tumorale, traitements et mesures

La prise tumorale s'effectue en plus ou moins un mois en fonction du modèle. La tumeur est mesurée avec un pied à coulisse. La souris est pesée une à deux fois par semaine. Des mesures régulières permettent l'évaluation de la croissance tumorale et l'efficacité des peptides administrés. Le mode d'administration utilisé est l'injection intrapéritonéale.

Des prélèvements de sang sont effectués juste avant la mise à mort sous anesthésie générale.

La mise à mort de l'animal sera faite par dislocation cervicale.

Critères de point-limites

Les points limites suivants sont observés pour les animaux, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie:

- perte de poids
- taille de la tumeur
- baisse de l'état général (prostration, plaie, ...)

Les animaux sont alors sacrifiés par dislocation cervicale si un des point-limites est atteint.

24- 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.

Expérimentation

Greffes et passages

Les souris utilisées sont des Swiss-Nude à l'âge adulte de 5-6 semaines. Elles reçoivent des xénogreffes de tumeurs de sein humaines déjà établies sur des souris.

Le nombre d'animaux greffés est de 15 par groupe. Ce nombre dépend du taux de prise des modèles.

25- Rationnel: L'obésité est associée à une inflammation chronique initiée au sein du tissu adipeux blanc par l'infiltration de différentes cellules immunes, principalement les macrophages, dont l'accumulation est considérée comme un élément déclenchant du développement de l'insulinorésistance.

Des modifications du microbiote intestinal (ou dysbioses) ayant été observés chez les sujets obèses, l'utilisation de probiotiques (microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé) ou de prébiotiques (fibres alimentaires favorisant la croissance des probiotiques au niveau intestinal) capables de moduler/restaurer l'équilibre du microbiote, mais également de diminuer l'inflammation associée, a été proposé comme une stratégie de contrôle des troubles métaboliques, en particulier ceux associés à l'obésité.

Objectifs: Nos travaux antérieurs indiquent clairement que les capacités protectrices des probiotiques sont souche-spécifiques. Nous évaluerons donc l'impact de la consommation de probiotiques et/ou de prébiotiques sur le développement de l'obésité et de l'inflammation qui lui est associée, chez la souris. Seules les combinaisons ayant préalablement été démontrées *in vitro* comme possédant des propriétés anti-inflammatoires seront testés dans nos modèles d'obésité ('Réduction'). Par ailleurs, notre étude vise à élucider les mécanismes d'action des probiotiques/prébiotiques dans le développement de l'obésité et de l'insulinorésistance ; processus physiopathologiques mettant en jeu de nombreux tissus et organes ainsi que divers types cellulaires. Ceci impose donc le choix d'approches expérimentales *in vivo* et *ex vivo* chez la souris ('Remplacement').

Modèles Animaux et Méthodologie Nous testerons l'effet de différentes souches, mélanges de souches, de prébiotiques ou de symbiotiques (association de pré- et de probiotiques) dans différents modèles de souris obèses et/ou diabétiques reconnus comme étant les modèles de référence dans le domaine. Les souris (mâles) ob/ob (déficientes pour la leptine) et db/db (déficientes pour le récepteur de la leptine) sous fond génétique C57BL/6 seront nos modèles d'obésité d'origine génétique. Des souris (mâles) C57BL/6 soumises à un régime hyperlipidique (régimes commercialisés sous forme de croquettes irradiées, à 45% ou 60% de calories provenant des lipides) constitueront notre modèle d'obésité d'origine alimentaire, plus proche de celle

observée chez l'Homme. Les souris sauvages C57BL/6 ou les modèles d'altération métabolique commercialement disponibles (ob/ob et db/db) seront obtenus auprès de fournisseurs agréés. Chaque expérience sera réalisée sur un nombre maximal de 15 souris par groupe et comprendra un maximum de 6 groupes soit : 90 souris maximum par expérience, 180 souris par an (2 expériences/an) ; soit un total de 900 souris sur 5 ans. Dans ces modèles, l'insulinorésistance s'observe classiquement à partir de la 12^{ème} semaine de mise sous régime ; les expériences seront donc arrêtées à la 17^{ème} semaine ('Raffinement').

Les critères expérimentaux suivis seront les suivants : 1) prise de poids corporel et prise alimentaire (relevés hebdomadaires), 2) inflammation locale (au sein du tissu adipeux blanc) et systémique (prélèvements de sang en cours d'expérience et lors du sacrifice ainsi que récupération de divers tissus et organes lors du sacrifice), 3) métabolisme glucidique et lipidique (tests de tolérance au glucose ou de sensibilité à l'insuline *in vivo* en cours d'expérience) et 4) étude de la perméabilité intestinale.

Retombées attendues: 1) Efficacité thérapeutique : sélection de souches ou mélanges de souches ayant des effets bénéfiques sur l'obésité et étude préalable avant l'investigation d'un traitement chez l'homme (intérêt de partenaires industriels avant des investigations en études d'intervention nutritionnelle) 2) Elucidation des mécanismes d'action des probiotiques/prébiotiques dans un contexte physiopathologique mimant l'obésité et le syndrome métabolique associé.

26- Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) est responsable d'une maladie grave caractérisée par un syndrome fébrile à manifestations hémorragiques sévères pouvant causer la mort dans 30 à 40% des cas. Principalement présent en Europe de l'Est et en Turquie, ce virus constitue une menace sérieuse pour l'ensemble des pays Européens. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour lutter contre cette infection. Un groupe de surveillance épidémiologique européen considère le développement d'un vaccin ou d'une approche thérapeutique contre le virus CCHF comme étant d'une importance majeure.

C'est dans ce contexte que nous souhaitons étudier, dans un premier temps, chez le modèle murin, l'efficacité de neutralisation d'anticorps, purifiés sous forme de fragments F(ab')₂, spécifiques du virus CCHF.

Ce projet regroupe 2 procédures expérimentales, chacune nécessitant un effectif de 80 animaux. Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est donc de 160 souris.

Afin de raffiner les expérimentations, les animaux sont visités au moins une fois par jour par des personnels qualifiés et expérimentés. Les premiers signes cliniques liés à la pathologie étudiée pourront ainsi être observés et enregistrés.

27- L'arthrose est une pathologie commune chez le chien. C'est une maladie chronique due à une destruction progressive des tissus articulaires tels que l'os, le cartilage et la membrane synoviale, et est associée à une inflammation et des douleurs qui peuvent être handicapantes. Elle touche environ 20% de la population canine adulte (jusqu'à 80% chez les animaux âgés), et affecte principalement les articulations du grasset, du coude, de l'épaule et de la hanche. Parmi les traitements actuels de l'arthrose, aucun ne permet de traiter le processus arthrosique. La prise en charge des chiens arthrosiques associe un traitement non pharmacologique (contrôle du poids, exercice ...) à un traitement pharmacologique. Les traitements actuels sont uniquement symptomatiques (analgésiques et anti-inflammatoires). Pour les stades les plus avancés, un traitement chirurgical peut être réalisé, comme un remplacement total de l'articulation. Ces traitements s'accompagnent souvent d'effets secondaires qui peuvent être importants; c'est pourquoi il est important de développer de nouvelles thérapies préventives de type compléments nutritionnels, qui présentent moins de dangers lors d'une utilisation au long cours.

Afin de tester l'efficacité d'un mélange de composés nutraceutiques sur le survenue et la progression de l'arthrose, nous souhaitons développer une méthode non invasive d'évaluation de l'arthrose en utilisant comme modèle animal la souris au cours du vieillissement. L'arthrose étant une maladie multifactorielle et concernant l'ensemble de l'articulation, des modèles *vivo* sont indispensables. L'administration du mélange nutraceutique sera effectuée par voie orale dans l'alimentation des animaux du groupe test (15 souris âgées de 18 mois). Deux groupes contrôles seront ajoutés: un groupe de 15 souris du même âge et un autre groupe de 15 souris plus jeunes ne présentant pas de signes d'arthrose (6 mois), tous deux recevant de l'alimentation standard.

Compte-tenu que la survenue et la progression de l'arthrose varient entre individus, et que nous utilisons des méthodes d'investigation non-invasives, ces nombres d'individus représentent le minimum pour la faisabilité de l'étude.

Les méthodes non invasives utilisées pour évaluer la progression de l'arthrose et l'efficacité du mélange nutraceutique seront réalisées par radiographie et par l'utilisation du système CatWalk® (analyse de la marche de l'animal par système informatisé). Ces deux approches ont pour avantage majeur de réduire au strict minimum l'atteinte faite à l'animal. Ainsi, aucuns dommages particuliers, autres que ceux naturellement rencontrés lors du vieillissement, ne sont à anticiper. A la fin du protocole, les souris seront euthanasiées par asphyxie au CO₂ afin de prélever les membres postérieurs et d'apprécier par histologie les changements apportés par le traitement avec le mélange nutraceutiques, et de valider les méthodes non invasives d'évaluation de l'arthrose.

28- Ce projet consiste en des travaux pratiques (TP), dont le but est de déterminer la clairance rénale de l'inuline (molécule de référence) et de l'acide para-amino-hippurique (PAH) chez le lapin en diurèse provoquée. Ces TP permettront de contrôler la fonction rénale de l'animal et de déterminer le "comportement" du PAH au niveau rénal par rapport à l'inuline. Pour cela, du sang et les urines seront prélevés sur animal anesthésié (après cathétérisme de la veine jugulaire, de l'artère carotide et des uretères), avant et après injection intraveineuse de l'inuline et du PAH.

Ces TP s'inscrivent dans les enseignements de physiologie animale et s'adressent à des étudiants de 1^{ère} année destinés à la profession de technicien. Ces derniers doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique (Inserm, INRA, CNRS) ou encore dans des structures privées travaillant dans le domaine de la pharmacologie entre autres. Ils

peuvent donc être amenés, au cours de leur futur emploi, à travailler sur animaux vivants. Les professionnels, susceptibles de les recruter, souhaitent qu'ils soient bien formés aux différentes techniques utilisées en expérimentation animale.

Dans ce contexte, les objectifs du projet s'intègrent dans un ensemble d'objectifs pédagogiques et de formation relatifs à la biologie, la physiologie et l'expérimentation animales:

- Illustrer les cours sur la fonction rénale.

- Familiariser et responsabiliser les étudiants à l'expérimentation animale et à son éthique (manipulation et surveillance d'un animal anesthésié).

• Pratiquer divers actes expérimentaux sur l'animal: cathétérisme d'artères (prélèvements de sang), de veines (perfusion, injection de substances) et des uretères (recueil d'urine simultanément aux prélèvements de sang).

- Acquérir des compétences techniques pour un autre modèle animal que le rat: le lapin, souvent utilisé en pharmacologie 1 toxicologie.

• Préparer les étudiants aux enseignements pratiques de la formation d'expérimentation animale (niveau praticien) dispensée en 2ème année dans l'établissement.

L'ensemble de ces objectifs ne peut être atteint sans pratique sur l'animal entier vivant.

Par ailleurs, le nombre d'animaux sera réduit au cours de ces TP. En effet, un lapin sera attribué à 4-5 étudiants au lieu de 3 comme envisagé auparavant, en adéquation avec une participation active de chacun aux différentes tâches. Il y aura ainsi 21 lapins utilisés au maximum pour 98 étudiants maximum par an et renouvelés tous les ans pendant 5 ans. Ceci permet de prévoir une utilisation de 7 animaux de moins par an pour ces TP.

Enfin, un protocole d'anesthésie longue a été mis au point pour ces TP, qui durent 4h. Cette anesthésie associe un barbiturique et un analgésique, qui permettent une prise en charge totale de la douleur ainsi qu'une bonne myorelaxation de l'animal placé dans un environnement sonore et lumineux adapté, jusqu'à l'euthanasie par excès d'anesthésique en fin de TP.

29- La sclérose en plaques est une maladie auto-immune invalidante touchant le système nerveux central; son développement dépend également de facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux. Parmi les cellules immunitaires, potentiellement impliquées dans la maladie chez l'homme, des lymphocytes T CD4 et CD8 possédant une auto-réactivité contre la myéline du système nerveux central (cerveau et moelle épinière) entraîneraient une inflammation et la destruction des gaines de myéline. Notre but est mieux comprendre l'influence de ces deux populations T au niveau du système nerveux et d'identifier les facteurs aggravant la maladie. A terme, nous espérons ainsi mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cela, nous utiliserons deux modèles murins transgéniques modélisant la neuroinflammation induite par des lymphocytes T autoréactifs dirigés contre les oligodendrocytes qui produisent la myéline (encéphalomyélite auto-immune). Le premier modèle "CD4" utilise des souris transgéniques ayant des lymphocytes T CD4 qui, une fois réactivés, attaquent les oligodendrocytes. Le modèle "CD8" est un nouveau modèle issu du croisement de lignées de souris transgéniques dont les lymphocytes T CD8 réactivés attaquent spécifiquement les oligodendrocytes. L'utilisation de ces modèles murins ne peut être remplacée par des méthodes alternatives in vitro ou par les études sur le sang ou le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet seront effectuées sur une centaine de souris issues de notre élevage et des croisements nécessaires et utiles.

30- Ce projet a pour but d'évaluer l'efficacité relative de 4 lots expérimentaux de vaccin contre la rage chez le chien. L'efficacité et l'innocuité du produit doivent en effet être optimisées et validées pour le bon développement du vaccin.

Le protocole sera réalisé comme suit: pour chaque lot, 10 jeunes chiens seront vaccinés. Leur santé sera vérifiée par des examens cliniques quotidiens les 3 jours suivant la vaccination. L'efficacité sera évaluée par les suivis des sérologies antirabiques à 4 temps clé.

L'utilisation de chien sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type d'évaluation.

Le nombre d'animaux utilisés (40 chiens au total) correspond au minimum requis pour répondre à l'objectif du projet.

31- L'essai de Toxicité aiguë selon la méthode par classe est réalisé dans le cadre de l'évaluation du risque toxicologique des substances. Les résultats sont destinés à générer des données sur le produit à étudier avant d'entreprendre des études de toxicologie (plus longues et nécessitant plus d'animaux) obligatoires afin d'établir les dossiers de demande d'autorisation à fournir aux autorités d'enregistrement.

Selon la ligne directrice OCDE 423, une substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux (souris ou rat) d'un seul sexe (normalement des femelles) sont utilisés à chaque étape.

Une dose déterminée de la substance est administrée à un groupe d'animaux. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape détermine l'étape suivante, c'est à dire:

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Ce processus séquentiel permet d'utiliser le moins d'animaux possible (3 animaux par groupe, entre 2 et 8 groupes selon le niveau de toxicité de la substance à tester, soit entre 6 et 24 animaux).

Le projet utilisera 120 animaux au maximum par an soit 600 animaux sur les 5 années d'autorisation de projet.

La symptomatologie toxique et les éventuelles doses létales de l'élément d'essai à étudier sont identifiées après administration unique chez le rongeur.

Après traitement, un suivi comportemental et pondéral des animaux est effectué. Tout animal montrant des signes cliniques modérés ou intenses, ou une perte de poids importante (>20%) fait l'objet d'une euthanasie. Les observations portent en particulier sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention porte en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma.

La méthode de toxicité par classe de toxicité aiguë permet le classement de la substance d'essai selon le Système Général Harmonisé de Classification (SGH) et d'Étiquetage des Produits Chimiques.

Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux pour ce type d'évaluation toxicologique.

L'étude est réalisée selon les recommandations de la ligne directrice de l'OCDE 423 (OCDE, 2008) et la directive 440/2008 de l'union européenne (CE, 2008).

32- La sarcopénie est un syndrome caractérisé par la perte progressive de la masse musculaire squelettique et de la force avec un risque d'effets indésirables pouvant provoquer un handicap physique, la baisse de la qualité de vie ou un décès. De nombreuses études ont porté sur les modifications de la structure des muscles et sur les mécanismes cellulaires responsables de ces changements. En 2010, le groupe de travail européen sur la sarcopénie chez les personnes âgées (EWGSOP) a recommandé de vérifier la baisse de la masse et de la fonction musculaire (force et/ou performances) dans le diagnostic de la sarcopénie chez les patients. De multiples facteurs sont impliqués dans le développement de la sarcopénie dont l'âge, le mauvais état nutritionnel, les pathologies chroniques, l'inactivité physique et les traumatismes musculo-tendineux fréquents chez les sportifs. Notre objectif est de mesurer l'évolution des performances physiques avant et après réduction musculaire et durant la récupération.

Les modèles animaux de sarcopénie diffèrent par leur mode d'induction, leur durée, leur intensité, leur caractère réversible et le ou les muscle(s) atteint(s). L'intérêt du modèle de réduction musculaire par maintien articulaire est d'obtenir une atteinte du membre assez rapidement, d'intensité progressive, réversible, localisée et pouvant être comparée avec l'autre membre intact du même animal.

Notre but est de mettre en évidence si la diminution des capacités physiques d'un individu est liée à la diminution de sa masse musculaire et montrer si une action sur la perte de masse musculaire permettrait d'agir sur l'évolution des performances physiques.

L'évaluation de la locomotion s'effectue sur animaux vigiles et est basée sur des paramètres mesurés lors de tests comportementaux chez le rat, rendant impossible le remplacement de l'animal par des techniques alternatives. L'étude portera sur 50 rats mâles adultes Wistar Han de 300g, réutilisés d'un projet précédent agréé par le CELMEA (CELMEA-2012-0012), afin d'obtenir un nombre réduit de rats par groupe mais suffisant pour l'analyse statistique des données recueillies. Les individus entrant dans l'étude devront présenter un état physique et un comportement normal en accord avec leur espèce. Leurs consommations alimentaire et hydrique ainsi que leur poids seront mesurés deux fois par semaine. Les animaux ne devront pas perdre plus de 10% de leur poids d'origine durant l'étude. Un contrôle de l'absence de signes de douleur, de stress et d'anxiété sera effectué quotidiennement tout au long de l'étude.

En cas d'inflammation localisée à l'extrémité de la patte maintenue, il sera contrôlé l'absence de douleur, que la sensibilité de la région enflammée est bien conservée et l'absence de blessures. Les animaux ne répondant pas à ces critères seront exclus de l'étude et une prise en charge en conformité avec les recommandations éthiques sera effectuée.

33- Dans de nombreux projets de recherche, de nombreux prélèvements de sang sont effectués sur la souris et souvent de manière répétée. Il n'est pas possible de le faire autrement que sur des organismes entiers (pas de méthode de remplacement possible de manière évidente dans ce cadre, un des R de la règle des 3R), La question ici est de voir si avec une anesthésie et/ou un analgésique adaptées (en vue de raffiner la procédure, autre R de la règle des 3R), la récupération de l'animal peut être améliorée sans modifier les paramètres biochimiques et hématologiques. De plus, de nombreuses bases de données ont été établies avec la technique de prélèvement au sinus rétro-orbitaire.

Cette dernière étant actuellement controversée, nous voulons essayer la technique de prélèvement à la mandibule dans l'objectif de raffiner là aussi l'utilisation des animaux et voir si elle influe sur le stress et les paramètres hémato-biochimiques de manière différente.

L'objectif principal est donc d'utiliser ces 89 animaux dans un cadre scientifique afin de pouvoir valider de nombreux résultats biochimiques et hématologiques déjà obtenus avec la technique de prélèvement au sinus orbitaire et ce de manière identique avec la technique de prélèvement à la mandibule: ceci permettra d'éviter de devoir reconstituer toutes les bases de données obtenues par ailleurs (pas de répétitions inutiles) et donc de contribuer à la réduction (un des R de la règle des 3R) du nombre des animaux utilisés.

34- Afin d'analyser le rôle d'une protéine de la matrice osseuse, la BSP, dans l'angiogenèse et l'hématopoïèse nous insérerons des éponges de collagène chargées en cellules stromales de la moelle osseuse sous la peau de souris normales et de souris présentant une extinction du gène de la BSP. Ces implants seront ensuite le siège de la formation d'os sous cutané (os ectopique, « ossicules ») qui seront ensuite analysés par diverses techniques d'imagerie quantitative, de cytométrie et de biologie moléculaire.

Notre objectif est de clarifier si l'extinction de la BSP intervient dans l'angiogenèse et l'hématopoïèse par l'intermédiaire des cellules stromales ou de la lignée hématopoïétique.

Les procédures impliquées concernent 72 souris au total (4 lots de 6 souris pour une expérience, qui sera répétée 3 fois), dont la moitié porteuses d'une modification génique éteignant l'expression du gène BSP. La durée de l'expérimentation sera de 30 jours, minimum requis pour le développement complet des ossicules. Les souris seront réparties en lots de 6 individus, minimum suffisant pour atteindre la puissance statistique requise. Elles seront opérées et imagées (tomographie) sous anesthésie et traitées avec des analgésiques en péri-opératoire.

35- Le but de ces études est d'apporter des nouvelles solutions aux éleveurs face aux échecs constatés sur le terrain et les pathologies en constante évolution ; les pertes directes des éleveurs étant dues à des maladies

Ces projets consistent, à la recherche et à l'étude de l'innocuité et de l'efficacité de différentes formulations d'autovaccins ou de vaccins administrées seules ou en complément d'un vaccin commercial et de proposer des nouveaux protocoles de vaccination de façon à limiter les interventions sur animaux et ainsi limiter le stress des animaux.

Les critères d'innocuité sont jugés selon l'innocuité locale en étudiant les réactions aux points d'injection après vaccination et l'innocuité générale en mesurant le taux de morbidité et le taux de mortalité.

La vaccination La posologie des produits vaccinaux ainsi que le choix de la voie d'administration se font selon les préconisations.

Les critères d'efficacité sont jugés, après une épreuve de virulence, selon le taux de morbidité, de mortalité et la présence ou non de lésions cliniques à l'autopsie. Ces critères peuvent être complétés par des analyses sérologiques.

L'épreuve de virulence Varie selon un modèle expérimental préalablement mis en place.

Le nombre d'animaux et les espèces Les études se déroulent sur les animaux cibles de type conventionnel provenant directement du terrain, tel que volailles (poules, canards, dindes) ou lapins. Le nombre d'animaux utilisés est un nombre minimum et suffisant de façon à pouvoir analyser l'étude par un test statistique et obtenir des résultats significatifs.

36- L'objectif de notre équipe est de comprendre pourquoi les cellules hématopoïétiques des hémopathies malignes présentent des anomalies de leurs propriétés d'autorenouvellement et/ou de différenciation qui aboutissent au phénotype leucémique. Pour cela, nous utilisons diverses approches in vitro (cultures à plus ou moins long terme, en milieux semi-solides voire sur couche de cellules nourricières). Cependant, pour apprécier les propriétés d'autorenouvellement à moyen-long terme que nous étudions plus particulièrement, le recours aux modèles murins est indispensable. En effet, le processus de l'hématopoïèse in vivo, ne peut pas être reconstitué complètement in vitro. Nous avons besoin d'utiliser la souris pour nous rapprocher de la complexité des processus leucémogènes rencontrés chez les patients.

De plus, les modèles in vitro ne permettent pas de culture des progéniteurs hématopoïétiques sur des temps aussi longs que ceux permis par les modèles murins. Ainsi, la démonstration formelle du caractère « souche » d'une cellule hématopoïétique requiert la mise en évidence d'une reconstitution de l'hématopoïèse à long terme chez la souris, et idéalement, la transplantabilité à un animal secondaire.

Pour atteindre cet objectif, nous utilisons des cellules progénitrices humaines CD34+ issues de sang placentaire humain ou de moelle de patients atteints de certaines hémopathies, nous les modifions éventuellement par infection lentivirale pour moduler l'expression de telle ou telle voie que nous étudions (détail ci-dessous) et nous greffons ces cellules à des souris immunodéprimées. Les propriétés de prise de greffe primaires et secondaires ainsi que de modification phénotypique des cellules greffées sont alors comparées avec des conditions contrôles. Ceci nous permet de mieux comprendre le rôle des modifications que nous apportons à ces cellules. Les trois volets d'études de notre projet comportent:

- l'étude d'un gène de fusion MYB-GATA1 que nous avons découvert dans une leucémie aiguë basophile pédiatrique, dont nous cherchons à comprendre les propriétés et le rôle dans la leucémogénèse.

- l'étude de la modulation d'expression de certains micro-ARN qui présentent des propriétés régulatrices de cellules souches démontrées (miR-302) ou en cours d'évaluation (miR-10a).

- l'étude de la modulation d'expression de tyrosine-kinases dont nous avons montré qu'elles sont importantes dans la leucémogénèse de certaines hémopathies et dans leurs résistances aux traitements.

Nous prévoyons d'utiliser 80 souris pour chacun des trois volets, qui sont le nombre minimal permettant une interprétation statistique des résultats, soit 240 souris au total.

Seules les procédures expérimentales strictement nécessaires seront mises en œuvre. Les procédures de greffe (administration de substance) et de prélèvements (moelle, sang) seront faites sur animaux analgésiés et anesthésiés.

Les cellules greffées à l'animal pourraient provoquer une leucémie. L'estimation de la souffrance sera réalisée par le personnel de l'animalerie. Les critères utilisés seront ceux de Lloyd et al. (Lab Animal 1998, pièce jointe). Le score limite est de 14. Au-delà l'animal sera euthanasié sans attendre.

37- La formation commune de base des étudiants inscrits en pharmacie implique d'aborder des notions fondamentales de physiologie animale et humaine et de pharmacologie. Ainsi, des cours magistraux, enseignements dirigés et travaux pratiques sont proposés. Ces derniers, proposés à partir de logiciels informatiques, permettent de sensibiliser l'ensemble des étudiants à la pharmacologie expérimentale et à la compréhension des mécanismes d'action des molécules médicamenteuses. L'utilisation de ce logiciel informatique permet de former les étudiants dans leur ensemble en respectant les exigences de remplacement et de réduction d'utilisation des animaux à des fins expérimentales.

Avec la réforme des études de santé mise en place il y a maintenant trois ans, des unités d'enseignements optionnelles ont été incluses dans les maquettes de formation. Ces enseignements, permettent de préparer de petits groupes d'étudiants à leur insertion professionnelle. C'est pourquoi, afin de sensibiliser les étudiants de pharmacie aux métiers de la recherche, une unité d'enseignement d'expérimentation animale appliquée à la physiologie et à la pharmacologie est proposée en 2^{ème} et 3^{ème}

années d'étude. Cette formation, dispensée à un nombre restreint d'étudiants, a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la réactivité vasculaire mais également d'aborder le mécanisme d'action de diverses molécules médicamenteuses dans le contrôle de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

Par respect des règles éthiques, ces travaux seront réalisés sur un nombre restreint d'animaux (rats mâles âgés de 8 à 10 semaines) soit 20 rats, à raison d'un rat par jour de travaux pratiques pour quatre binômes d'étudiants. Enfin, pour répondre aux règles de raffinement, si des variations trop importantes de pression artérielle ou une modification importante des fonctions vitales de l'animal (respiration, fréquence cardiaque), les animaux seront retirés de l'expérimentation et euthanasiés.

38- La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant le rejet de greffe n'est pas entièrement contrôlé et représente aujourd'hui l'obstacle majeur en transplantation.

Le rejet de greffe se caractérise à la fois par un rejet du à une présentation directe et indirecte des antigènes du donneur. La présentation directe est liée principalement au rejet aigu alors que la présentation indirecte est liée au rejet chronique. Aujourd'hui, alors que le rejet aigu est maîtrisé en clinique par l'administration d'immunosuppresseurs aux patients; le rejet chronique reste difficile à éviter.

Au sein de notre unité, nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe à l'aide de modèle de greffes chez l'animal.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons étudier les mécanismes de rejet lié uniquement à la présentation d'antigène de façon indirecte aux cellules T CD4+ chez la souris (*Mus musculus*). Ceci est possible en réalisant des greffes (de peau) provenant de souris B6Kd dans des souris receveuses de type C57BL/6. De façon plus précise, nous souhaitons développer des stratégies pour inhiber ce rejet chronique. Pour cela, nous allons tester la capacité de certaines molécules (notamment Tmem176 et MR1) et/ou de cellules immunitaires (notamment des progéniteurs de la moelle osseuse ou des cellules B) à réduire ce rejet de greffe. Nous estimons que ce projet nécessitera environ 1000 souris (comprenant des souris C57BL/6, B6Kd et Tmem176b KO). En ce qui concerne les conditions des 3R, la réalisation de greffes chez la souris est indispensable pour étudier les mécanismes de rejet de greffe. Nous réaliserons un groupe de greffe tous les 15 jours. Nous pensons que les greffons seront rejetés en environ 10-15 jours en l'absence de traitement.

Si nos traitements n'ont pas d'effet, nous le saurons donc avant le prochain groupe d'animaux greffés.

39- Les approches de thérapie génique pour les maladies héréditaires sont aujourd'hui bien développées et commencent à faire preuve de leur efficacité en clinique. Cependant, l'absence de contrôle du site d'intégration du gène thérapeutique reste un obstacle. Cela représente un risque de mutagenèse insertionnelle et donc de cancérogenèse comme cela a déjà été observé dans un essai clinique.

Ainsi, le ciblage de l'intégration du transgène constituerait un progrès considérable répondant aux exigences médicales et réglementaires. Les nucléases artificielles, comme les zinc finger nucléases (ZFNs) et les Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALENs) sont des outils prometteurs pour atteindre cet objectif. Ce sont des ciseaux moléculaires qui peuvent réaliser une coupure de l'ADN spécifique d'un site choisi. La cassure peut être réparée par recombinaison homologue (RH) avec intégration ciblée d'un gène thérapeutique ou la correction de mutations.

Notre projet consiste à utiliser ces nucléases pour la réparation de mutations par recombinaison homologue pour l'appliquer aux maladies héréditaires du foie, en particulier à maladie modèle de Crigler Najjar de type 1 (CNI). CNI est causée par la déficience d'une enzyme du foie, l'UGT1A1, permettant la conjugaison et l'élimination de la bilirubine. Le rat Gunn est le seul modèle animal spontané de cette maladie. Il présente une mutation du gène codant l'UGT1A1. Les rats homozygotes pour cette mutation sont reconnaissables par leur jaunisse présente à la naissance: ils miment le phénotype des patients.

Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré une correction du rat Gunn à long terme avec des vecteurs lentiviraux et à court terme avec des vecteurs AAV chez le nouveau-né et à long terme avec des vecteurs adénoviraux.

Nous utilisons des AAVs pour apporter des ZFNs ciblant la région mutée chez le rat Gunn et un modèle de réparation (donneur) non muté dans le foie. Nous utilisons également des vecteurs adénoviraux pour vectoriser les TALENs, de taille trop importante pour être vectorisées par un seul AAV. Cela devrait permettre le développement d'une stratégie de correction génique de la mutation du gène UGT1A1 chez le rat Gunn.

Un total de 310 animaux au maximum est prévu dans ce projet. Lorsque des données préliminaires sont disponibles, nous les utilisons pour limiter les étapes de mise au point notamment pour le choix des doses à injecter. Cela permet de réduire le nombre d'animaux impliqués. Les groupes contrôles inclus dans les procédures les moins invasives peuvent ici servir de contrôles aux autres procédures pour réduire le nombre d'animaux témoins. Des rats Gunn sont utilisés dans les phases de réparation génique. Des rats Wistar, souche d'où proviennent les rats Gunn, peuvent être utilisés dans la mise au point des gestes techniques et les phases de choix de doses de vecteurs lorsque cela est nécessaire.

Le rat Gunn représente un modèle de thérapie génique de CNI et des nombreuses maladies héréditaires du foie dues à une mutation sur un gène unique (hémophilies A et B, maladies de Wilson, glycoséoses). Les résultats obtenus dans notre projet pourront donc servir pour le traitement de nombreuses autres maladies.

40- Parvenir à une acceptation du greffon à long terme, sans traitement immunosuppresseur, et sans rejet chronique, constitue un but majeur, mais encore inaccessible en transplantation d'organe en clinique. Le foie est un organe au statut immunologique particulier. Cela se traduit en clinique par une fréquence élevée de tolérance spontanée après allotransplantation, puisqu'environ 20% des patients transplantés tolèrent un greffon hépatique après arrêt de leur traitement immunosuppresseur,

mais aussi au niveau préclinique, par une capacité à induire une tolérance au produit d'un transgène exprimé dans le foie, après transduction par des vecteurs de thérapie génique.

Notre but est d'étudier les mécanismes impliqués dans ces processus de tolérance et d'en tirer profit afin de développer des outils de prédiction et d'induction de tolérance applicables à l'allogreffe de foie et d'îlots pancréatiques.

Le but de ce projet est d'évaluer si un protocole de thérapie génique consistant à exprimer spécifiquement dans le foie de souris receveuses, des alloantigènes de souris donneuses permet d'induire une tolérance immunologique à une greffe allogénique.

Les mécanismes immunologiques impliqués seront identifiés et analysés.

Au cours de ce projet, nous utiliserons 432 souris C57Bl/6, 324 souris Balb/c et 324 souris C3H soit un total de 1080 souris. Il n'existe actuellement aucun modèle de greffe remplaçant le modèle animal (Remplacement). Le nombre d'animaux estimé dans ce protocole est suffisant pour justifier d'une pertinence scientifique (Réduction). Le protocole prend en compte au mieux le bien-être des animaux par un suivi régulier des animaux greffés et par une mise à mort la plus éthique possible des animaux donneurs d'organes (Raffinement).

41- L'unité étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe. Ainsi l'un des objectifs en transplantation est de comprendre les mécanismes du rejet et d'induire une tolérance spécifique du greffon qui permettrait au receveur de vivre sans la contrainte d'un traitement immunosuppresseur. Pour en étudier les mécanismes, nous devons donc faire appel à des modèles de greffes chez l'animal. Nous avons précédemment montré que le traitement de rats Lewis 1A par l'injection d'un adénovirus recombinant pour la molécule CD40lg (AdCD40lg) induit un état de tolérance à l'allogreffe d'un cœur issu d'un rat Lewis 1W, greffé en position hétérotopique intra-abdominale. Cette tolérance est permise par la génération de lymphocytes T régulateurs CD8+CD45RClow. La déplétion des cellules CD8+ par l'injection d'un anticorps chez le receveur empêche en effet l'établissement de la tolérance chez 50% des rats traités par l'AdCD40lg. Deux autres molécules exprimées par ces Tregs seront testées pour dépléter les Tregs, selon 2 groupes de 10 rats. Cependant 50% des rats traités par l'AdCD40lg et déplétés en cellules CD8+ tolèrent le greffon par un mécanisme encore non identifié. Notre projet consiste à étudier les mécanismes de la tolérance induite par le traitement AdCD40lg en l'absence de cellules CD8+ chez le receveur d'une greffe cardiaque allogénique (Lewis 1W sur Lewis 1A). 10 rats Lewis 1A seront traités par l'AdCD40lg et l'anticorps déplaçant les cellules CD8+ afin d'obtenir 5 rats tolérants. La survie du greffon sera comparée à celle de 5 rats traités par un anticorps irrelevant et l'AdCD40lg. Les mécanismes établissant cette tolérance seront étudiés, in vitro et in vivo, notamment par l'identification et l'étude des cellules régulatrices induites au moyen de transferts de cellules à de nouveaux receveurs irradiés. Les splénocytes de 5 rats présentant une survie à long-terme de l'allogreffe (>120 jours) seront transférés de façon adoptive à 3 nouveaux receveurs chacun. La capacité de tolérance infectieuse des splénocytes sera testée par transfert itératif de splénocytes et les cellules régulatrices mises en jeu seront identifiées par transfert adoptif de populations cellulaires purifiées par FACS Aria. Les analyses phénotypiques réalisées en 2007 orientent nos recherches vers l'induction de lymphocytes B régulateurs peu connus à l'époque, ce qui permet de limiter le nombre de rats utilisés pour l'identification de la population de cellules régulatrices et l'étude de leurs mécanismes d'action. Ce modèle de tolérance permettra d'approfondir les connaissances fondamentales quant aux lymphocytes B régulateurs, dans la perspective d'une application clinique par expansion de cellules régulatrices spécifiques du donneur chez les patients transplantés.

42- Le Trouble de Déficit de l'Attention/Hyperactivité (TDA/H) est une affection neuro développementale caractérisée par trois symptômes: un déficit attentionnel, une impulsivité et une hyperactivité. Ce trouble diagnostiqué à partir de 7 ans, affecte 5 à 8% des enfants et perdure dans 70% des cas à l'âge adulte. La stratégie thérapeutique de choix est la prise de médicaments qui appartiennent à deux classes: (i) les psychostimulants comme la ritaline et des dérivés d'amphétamines (lysdexamphétamine), (ii) les non psychostimulants comme l'atomoxetine et la guanfacine. Des patients sont donc potentiellement sous traitement pendant de longues durées et même si les cibles moléculaires de ces médicaments sont bien connues, leurs effets à long-terme sur le fonctionnement du cerveau en développement demeurent non élucidés.

Le but de cette étude est de mieux comprendre dans un modèle animal les conséquences à long-terme de l'exposition chronique à (i) la ritaline, (ii) la lysdexamphétamine, (iii) l'atomoxetine et (i) la guanfacine sur la fonctionnalité du cerveau au cours du développement. Ceci sera réalisé par imagerie scintigraphique chez le rat éveillé.

L'imagerie scintigraphique sera réalisée en injectant aux animaux un analogue radioactif du glucose qui est la source majeure d'énergie pour le cerveau. L'accumulation de ce glucose radioactif dans le cerveau est détectée par une caméra microTEP qui permettra de distinguer les modifications d'activité cérébrale consécutives aux différents traitements. Le rat est une espèce de choix pour ce travail car l'anatomie de son cerveau est bien caractérisée et la taille de son cerveau compatible avec la résolution spatiale des caméras microTEP. Dans ce type d'étude, il a été montré que la variabilité inter-individuelle impose un effectif de n=10 animaux par groupe pour voir un effet significatif des traitements sur l'activité cérébrale.

43- La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie auto-immune, affectant le système nerveux central et caractérisée par une inflammation généralisée provoquant une perturbation de l'ensemble du système immunitaire. Notre intérêt est particulièrement ciblé sur le rôle de macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière, la microglie et de cellules régulatrices immunes, les Natural Killer (NK), qui sont recrutées dans le système nerveux central (SNC) dans des conditions pathologiques. A l'aide du modèle murin de l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), nous cherchons à déterminer l'équilibre entre le versant neuroprotecteur et celui neurotoxique de ces cellules immunes. Les études du recrutement et du rôle des cellules immunes sont abordées à l'aide du modèle EAE, obtenu par injection sous-cutanée d'un fragment de myéline chez la souris. Les études préliminaires montrent que l'élimination de cellules NK entraîne l'aggravation de la maladie. Comme les

cellules NK se répartissent en différentes sous-populations au cours de leur maturation, nous chercherons à définir les sous-populations impliquées dans l'effet neuroprotecteur observé. Par ailleurs, de récents travaux montrent la fonction neuroprotectrice de la chimiokine CX3CL1/fractalkine (FKN), exprimée par les cellules neuronales. Son récepteur CX3CR1 est exprimé principalement par les cellules microgliales. Le rôle de la microglie sera ainsi étudié: i) *in vitro* à l'aide de culture de neurones, de microglie et de co-culture neurones/microglie chez les souris contrôles comparées à des souris invalidées pour les gènes NKp46 ou CX3CR1, marqueurs spécifiques des cellules NK ou microgliales; ii) *in vivo*, en étudiant l'impact de bloqueurs de la fractalkine tels que l'antagoniste FKN-AT ou des anticorps anti-CX3CR1 sur l'évolution de la maladie chez des souris développant une EAE. Un nombre total de 420 souris est prévu pour cette étude, avec application de la règle des 3R (10 souris/traitement, validation par les tests statistiques de Student ou Wilcoxon). L'identification des effecteurs neuroprotecteurs/neurotoxiques est en effet essentielle pour concevoir des stratégies thérapeutiques appropriées basées sur la modulation immunitaire.

44- Les astrocytes, cellules gliales qui constituent la population majoritaire dans le cerveau des mammifères, sont organisés en réseaux et entretiennent des interactions dynamiques avec les neurones. Le projet de recherche fondamentale que nous soumettons a pour objectif d'analyser si les réseaux astrocytaires sont modifiés dans le cortex cérébral de souris soumises à des perturbations du cycle éveil/sommeil et quelles en sont les conséquences sur l'activité des neurones.

Le cycle éveil/sommeil est un processus physiologique qui ne peut être reproduit *in vitro*, par conséquent notre projet nécessite le recours à des modèles animaux pour étudier les conséquences de ses perturbations. Dans ce projet deux procédures expérimentales appliquées à environ 120 souris seront mises en œuvre. D'une part des expériences de restriction de sommeil durant 6 heures seront effectuées dans des cages spécialement conçues pour réduire à son minimum le stress que peut provoquer une privation de sommeil. Le socle de ces cages est mis en rotation et trois petites cloisons verticales fixes empêchent la souris d'adopter une posture de sommeil durable dans un endroit de la cage plus de 6-8 secondes. Environ 70 souris seront incluses dans ce protocole, nombre requis pour réaliser des tests statistiques comparant des animaux privés ou non de sommeil de deux lignées différentes. D'autre part, des agents pharmacologiques non toxiques qui affectent le cycle éveil/sommeil chez l'homme et le rongeur seront injectés chez la souris par voie intrapéritonéale. Il s'agit d'une procédure peu douloureuse appliquée à 40 à 50 souris. A l'issue de ces deux procédures qui perturbent le cycle éveil/sommeil, les animaux seront euthanasiés selon la méthode recommandée par les comités d'éthique en expérimentation animale, i.e. pour les souris la dislocation cervicale, et leurs cerveaux seront prélevés. Les effets engendrés par ces traitements seront donc évalués *ex vivo* par des enregistrements électrophysiologiques dans les tranches de cerveau maintenues quelques heures en survie dans une solution physiologique ainsi que par des tests biochimiques sur des extraits de cerveau. Ce programme de recherche devrait contribuer à établir si les réseaux astrocytaires participent à la régulation du sommeil et sont impliqués dans les troubles du cycle veille/sommeil.

45- Le recours à l'animal a permis, dans le passé, de très nombreuses découvertes, tant pour une meilleure connaissance des maladies que pour en proposer des diagnostics plus précoces, des moyens de prévention ou de traitement efficaces. Les maladies dégénératives telles que l'arthrose, qui deviennent un réel problème de santé publique, lié au vieillissement de la population, nécessitent, pour être mieux comprises, le recours à l'étude sur l'animal.

Ainsi, de nombreux modèles animaux ont été développés avec pour objectif de caractériser les phases précoces de l'arthrose, d'étudier sa progression et d'évaluer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les modèles expérimentaux d'arthrose peuvent se classer en 2 grandes catégories: D'une part les arthroses post-traumatiques et d'autre part les arthroses métaboliques/structurales.

Même si les modèles dans lesquels l'arthrose est induite par des contraintes biomécaniques anormales consécutives à une instabilité articulaire (section ligamentaire ou ménisectomie), nécessitent en général une intervention chirurgicale, ces modèles d'instabilité articulaire ont l'avantage de confirmer les observations cliniques. Ainsi, le modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur est devenu un des modèles de référence pour l'étude de la pathologie de l'arthrose ou des effets des traitements. L'association à une lésion méniscale est moins bien documentée. Aucun modèle cellulaire *in vitro* ne permet d'appréhender globalement les contraintes articulaires (cartilage, os, ligaments, tendons) dans leur globalité (remplacer).

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons développer et caractériser le modèle de section du LCA associé à une lésion méniscale, modèle peu développé et mal caractérisé. 30 rats seront utilisés pour pallier la variabilité interindividuelle (réduire).

Raffiner: Toutes les mesures d'antalgie péri-opératoires seront entreprises tout comme une surveillance quotidienne des animaux (pesée, absence d'infection, état général, ...)

Pour ce faire, des rats seront opérés comme suit: 1) section du ligament croisé antérieur, côté droit; 2) section du ligament croisé antérieur + ménisectomie, côté droit 3) lésion méniscale isolée. Le côté gauche servira de témoin (arthrotomie seule, sans lésion associée, sham).

46- Ce projet est la suite d'une étude initiée en 2010. Notre projet initial visait à réaliser le phénotypage de notre lignée murine *trpm8*^{-/-} (KOM8). Le canal TRPM8 est le récepteur au froid des neurones thermosensoriels, mais nos précédents travaux ont permis de cloner de nombreuses isoformes exprimées dans d'autres organes et tissus. C'est pourquoi, en 2007, nous avons désigné une lignée knock-out (KO) qui constitue un KO fonctionnel détruisant la zone active des canaux (pore ionique) de l'ensemble des isoformes de TRPM8 ; cette invalidation du gène TRPM8 n'est pas létale pour les animaux. Le phénotypage de notre modèle, réalisé par l'ICS de Strasbourg, nous a amené à poser de nouveaux objectifs dont celui de caractériser les rôles de

ces isoformes dans le métabolisme énergétique et la thermogenèse en condition d'hypothermie. En effet, ces expériences nous ont permis de démontrer que cette lignée présente un phénotype « maigre » caractérisé par une augmentation significative de masse maigre et une diminution de la masse grasse. Les animaux KOM8 ne présenteraient pas de troubles digestifs (pas de variation des mesures de bombes caloriques comparé aux animaux CTL) mais consomment et consomment plus d'énergie que les animaux CTL. Les taux de glucose circulant sont normaux, et à la baisse en période à jeun, alors que les taux de triglycérides et d'acides gras (FFA) sont significativement diminués en période d'alimentation mais plutôt normaux en période à jeun.

D'autre part, ces animaux présentent une augmentation de leur RER (Respiratory Exchange Ratio) trahissant un métabolisme plus orienté vers la voie des carbohydrates, mais pas d'écart de glycémie par rapport aux animaux contrôles. Curieusement, les animaux KOM8 sont aussi un peu plus grands, et ont réalisé un meilleur test d'effort (distance et durée) que leurs congénères sauvages.

Enfin, ces animaux présentent aussi un métabolisme basal plus important induisant une production de chaleur supérieure à celle des animaux contrôles. En outre, nous avons montré que les animaux KO présentent une moins bonne adaptabilité de leur métabolisme basal en condition hypothermique. Ceci vient du fait que leur activité métabolique est très supérieure aux animaux contrôles en condition de thermoneutralité. Nous pensons que les animaux KO ont une température de thermoneutralité supérieure aux animaux contrôles.

Afin de déterminer le rôle des voies lipidiques et glucidiques dans le métabolisme énergétique des souris *trpm8*^{-/-}, nous voudrions réaliser une expérience de régime hyperlipidique. D'autre part, nous souhaitons déterminer si les animaux KOM8 sont résistants à la prise de poids en condition de régime hyperlipidique et si ce phénotype peut devenir un modèle intéressant dans la recherche sur le diabète.

Pour réaliser ces expériences, nous utiliserons notre lignée KOM8 (12 animaux) versus contrôle (CTR) (12 animaux); ce nombre d'animaux nous a permis d'obtenir des résultats significatifs lors de notre précédente étude, c'est pourquoi il ne nous est pas nécessaire d'augmenter ce nombre, par contre le diminuer nous ferait prendre un risque si certains animaux venaient à mourir pendant notre expérience. L'étude du métabolisme énergétique et de la thermogenèse d'un organisme vivant implique une activité synergique de multiples organes, ainsi aucune étude alternative ne nous permettra d'obtenir ces résultats expérimentaux. Enfin, nous avons optimisé notre protocole afin de pouvoir réaliser l'ensemble de nos prélèvements (sanguins, tissus) nécessaire à cette étude.

47- Le cartilage hyalin est un tissu conjonctif avasculaire, non innervé et très spécialisé. Sa fonction principale est de protéger l'os sous-jacent des agressions biomécaniques et traumatiques inhérentes à la mobilité et la locomotion, tout en assurant la répartition des chocs et le glissement harmonieux des surfaces articulaires. Cependant, de par son caractère avasculaire et de par le potentiel de division très limité des chondrocytes, le cartilage articulaire ne possède que de faibles capacités de réparation spontanée lorsque celui-ci est la cible de pathologies articulaires (arthrose) ou de lésions traumatiques. Le tissu de réparation obtenu est, par ailleurs, un fibrocartilage qui ne possède pas les capacités de résistance biomécanique du cartilage originel, et tend à se dégrader à court terme. Cette réparation inadéquate fait le lit d'une arthrose plus ou moins rapide.

Il apparaît donc nécessaire de proposer des solutions permettant de stimuler, guider et suivre la réparation du cartilage articulaire. Cette perspective semble dorénavant envisageable grâce à l'émergence et l'engouement pour l'ingénierie cellulaire et tissulaire. Ainsi, contrairement aux méthodes actuelles d'apport de matériel tissulaire autologue (méthode de Brittberg, perforations de Pridie), ce champ disciplinaire autorise la mise au point de biomatériaux adaptés à la demande: taille, composition de la matrice extracellulaire, culture et expansion des cellules autologues à ensemercer, contrôle du phénotype (F Croissance). Il faut cependant passer par une étape expérimentale chez le rat avant d'envisager une étude clinique (remplacer).

L'objectif de ce projet est de valider la biointégration et la biofonctionnalité d'un biomatériau fonctionnalisé implanté en site articulaire chez le rat. Cette expérimentation sera réalisée chez 162 rats (synthèse de 3 manipulations), afin d'optimiser les conditions expérimentales (raffiner) et pallier la variabilité de la cicatrisation/réparation.

Une première étape consistera à obtenir des cellules souches chez le rat par forage et ponction médullaire du tibia. Elles seront cultivées *ex vivo* dans un biomatériau fonctionnalisé à visée chondrogénique (matrice collagénique). Dans un second temps, un forage calibré du cartilage articulaire fémoral (condyle médial), du genou droit (genou gauche témoin (sham) réduire) sera fait. La lésion focale du cartilage sera ensuite implantée par le biomatériau et son devenir ainsi que sa biofonctionnalité seront suivis séquentiellement par histologie (3 temps de sacrifice). Raffiner: toutes les mesures d'antalgie péri-opératoires seront mises en œuvre et un examen quotidien (pesée, surveillance du comportement, absence d'infection, ...) sera réalisé.

48- Le recours à l'animal a permis, dans le passé, de très nombreuses découvertes, tant pour une meilleure connaissance des maladies que pour en proposer des diagnostics plus précoces, des moyens de prévention ou de traitement efficaces. Les maladies dégénératives telles que l'arthrose deviennent un réel problème de santé publique, lié au vieillissement de la population, et nécessitent, pour être mieux comprises, le recours à l'étude sur l'animal. Ainsi, de nombreux modèles animaux ont été développés avec pour objectif de caractériser les phases précoces de l'arthrose, d'étudier sa progression et d'évaluer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les modèles expérimentaux d'arthrose peuvent se classer en 2 grandes catégories: d'une part les arthroses posttraumatiques et d'autre part les arthroses métaboliques/structurales.

Même si les modèles dans lesquels l'arthrose est induite par des contraintes biomécaniques anormales, consécutives à une instabilité articulaire (section ligamentaire ou ménissectomie) nécessitent en général une intervention chirurgicale, ces modèles d'instabilité articulaire ont l'avantage de confirmer les observations cliniques (remplacer: les modèles *in vitro* de culture cellulaire reproduisent mal les contraintes articulaires). Ainsi, le modèle d'arthrose expérimentale par section du ligament croisé antérieur est devenu un des modèles de référence pour l'étude de la pathologie de l'arthrose ou des effets des traitements.

Réduire: 40 rats femelle seront utilisés (4 groupes de 10 pour pallier la variabilité des lésions sur le score histologique et éviter de répéter l'expérience). Raffiner: les animaux opérés (175 g) bénéficieront d'une antalgie pré et post opératoire et d'une surveillance quotidienne (pesée, surveillance de la plaie et du comportement, absence de points limites).

On savait que les ostéoblastes (cellules qui participent à la construction osseuse) et les cellules graisseuses (adipocytes) sont issus d'une même lignée de cellules souches.

Des travaux récents suggèrent que l'ocytocine pourrait jouer un rôle clé dans leur différenciation : peu d'hormone favoriserait l'adipogenèse, plus d'hormone l'ostéogenèse. De fait, on constate une diminution du taux circulant d'ocytocine chez des femmes ostéoporotiques et ménopausées par comparaison avec des femmes non ostéoporotiques du même âge. Enfin, des souris rendues ostéoporotiques ont vu un ralentissement de la perte osseuse et une diminution de la masse graisseuse dans la moelle osseuse après injection quotidienne d'ocytocine pendant huit semaines. Lors de l'arthrose, il est acquis que l'os sous chondral participe activement à la genèse des lésions articulaires

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons caractériser l'influence de l'injection répétée d'ocytocine lors d'un modèle d'arthrose expérimentale chez le rat (section du ligament antérieur (ACLX) et ainsi étudier son éventuelle action bénéfique dans les modifications de l'os sous-chondral observées dans l'arthrose.

49- Du fait de l'augmentation continue de la durée de vie des êtres humains, l'incidence des maladies associées à l'âge a significativement augmenté lors de ces dernières décennies. L'âge est effectivement considéré comme le principal facteur à risque de maladie sévère chez l'être humain. Une meilleure connaissance du processus de vieillissement au niveau moléculaire et cellulaire contribuera à la compréhension des maladies liées à l'âge et au développement d'approches thérapeutiques très spécifiques permettant aux êtres humains de vieillir dans les meilleures conditions.

Ces différentes approches ont été choisies par les chercheurs de ce projet afin d'être analysées chez l'animal de laboratoire avant de faire l'objet d'analyse chez l'être humain.

Des processus aussi complexes que le vieillissement ne peuvent pas être correctement étudiés ex vivo. Le vieillissement mais aussi la genèse des dysfonctionnements organiques impliquent des mécanismes complexes de régulation et des interactions au sein de l'organisme dans son ensemble. Ils ne peuvent être considérés comme des phénomènes isolés analysables au sein d'un seul type de cellule ou de tissu.

Pour ce projet, 2500 souris pourront être utilisées dans les 5 ans. En effet, chaque procédure sera renouvelée une fois par an pendant 5 ans (procédure 1 : 300 animaux x 5 + procédure 2 : 200 x 5 = 2500 animaux).

Le nombre d'animaux choisis pour ces procédures est toujours le nombre minimal nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatif.

La souris est un animal utilisé dans ce type de projet depuis de nombreuses années. C'est un mammifère dont l'anatomie et la physiologie sont proches des hommes, ce qui permet d'obtenir des informations fiables et pertinentes. La disponibilité de très nombreuses données historiques chez cette espèce permet d'analyser les données obtenues avec beaucoup de précision et de pertinence.

50- Ce protocole correspond à une étape préliminaire de l'étude de l'induction de tolérance par les corps apoptotiques en transplantation rénale.

La greffe d'organe et de tissus a connu au cours des trente dernières années un développement considérable qui a bouleversé le pronostic de nombreuses affections rénales, cardiaques, hépatiques, pancréatiques, des hémopathies malignes, non malignes et des déficits immunitaires. Néanmoins, en situation allogénique, toute transplantation d'organe implique des phénomènes naturels de rejet aigu ou chronique qui participent grandement aux dysfonctions et pertes de greffes. La prévention du rejet repose sur l'utilisation de thérapeutiques immunosuppressives lourdes permettant une meilleure survie des greffons mais leur usage s'accompagne de nombreux effets secondaires néfastes.

Aujourd'hui l'objectif majeur en transplantation reste clairement l'obtention d'un état de « tolérance immunitaire opérationnelle » ; c'est à dire d'observer une tolérance vis-à-vis des alloantigènes exprimés par le greffon, sans affecter la capacité du receveur à réagir de manière efficace contre divers antigènes exogènes.

Depuis de nombreuses années, les protocoles transfusionnels ont été utilisés avant transplantation dans le but d'induire la tolérance. En effet, les protocoles transfusionnels spécifiques du donneur avant greffe avec donneur vivant ont montré une amélioration significative de la durée de vie des greffons. Par ailleurs, plus récemment, des travaux expérimentaux ont mis en évidence les propriétés tolérogènes des cellules apoptotiques sur les lymphocytes T auto et alloréactifs dans différents modèles « petit animal » tels que la greffe de moelle osseuse et greffe d'organe solide (greffe cardiaque).

La stratégie thérapeutique serait d'injecter des cellules rendues apoptotiques (par traitement à l'irradiation gamma) provenant d'un animal donneur à un animal receveur d'un fond génétique différent. Cette pré-sensibilisation du receveur avec des cellules du donneur dans un contexte peu immunogène pourrait permettre une meilleure prise de greffe d'un organe du donneur. L'utilisation d'un modèle primate apparaît comme le plus adapté pour évaluer la tolérance à l'administration de corps apoptotiques allogéniques et notamment évaluer l'existence d'une éventuelle alloimmunisation anti-CMH. En effet, ce modèle s'apparente de manière la plus proche à la réponse alloimmune observée chez l'homme et permettra de statuer de manière plus avérée sur les risques immunogéniques et toxiques d'une telle stratégie de thérapie cellulaire.

Le but de cette saisine est de décrire une expérimentation animale, évaluant l'impact de l'injection de corps apoptotiques allogéniques sur la réponse immunitaire du receveur, de même que sa bonne tolérance.

51- La formation réglementaire à la chirurgie expérimentale (pour les chercheurs et pour les techniciens de laboratoire) est agréée par le Ministère de l'Agriculture. Cette formation a comme objectif d'assurer la formation spéciale complémentaire obligatoire à tout personnel réalisant des actes chirurgicaux sur l'animal dans des études utilisant l'animal de laboratoire vivant. La formation est organisée en Mars, Juin et Novembre de chaque année.

Cette formation suit un programme réglementaire validé par la Commission Nationale d'Expérimentation Animale (CNEA) avec des conférences (CM), des travaux dirigés (TD) et des travaux pratiques (TP).

Dans le cadre de cette saïone, seules les séquences pédagogiques utilisant des animaux seront décrites, à savoir :

Séances de TP d'anatomie

Séances de TP de chirurgie expérimentale

Séance de TP d'implantation de cathéters

Séance de TD d'anesthésie-monitoring

En fin de formation, les animaux sont généralement euthanasiés. A chaque fois nous recherchons, auprès de nos collègues enseignant-chercheurs, si une opportunité se présente pour les replacer dans un protocole ou utiliser leurs cadavres à titre pédagogique (séance de TP d'anatomie ou TP de sutures par exemple).

Le nombre de stagiaires par session de formation est variable d'une session à une autre et se trouve généralement de 10 à 15 maximum, ce qui amène à utiliser 27 rats et 24 lapins pour un groupe de 15 stagiaires, à chaque formation.

En matière de remplacement, l'utilisation de méthodes alternatives précède la mise en œuvre des techniques chirurgicales sur animaux vivants, par exemple pour la réalisation des sutures. En matière de réduction, le nombre d'animaux utilisé est restreint et l'organisation en groupe de travail est favorisée pour mutualiser (3 stagiaires pour un animal opéré en bloc opératoire par exemple). En matière de raffinement, les protocoles d'anesthésie-analgésie sont adaptés de manière à éviter toute douleur ou souffrance aux animaux. L'objectif de cette formation est d'améliorer la pratique quotidienne des stagiaires afin qu'ils puissent appliquer les principes du raffinement dans leurs expérimentations (meilleur choix des protocoles anesthésiques, meilleur monitoring et meilleure prise en charge post-opératoire par exemple), et ainsi obtenir une meilleure efficacité notamment une meilleure reproductibilité dans les résultats ce qui aboutit à une réduction du nombre d'animaux utilisés pour atteindre les objectifs scientifiques.

52- 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, un produit d'immunothérapie, dénommé le candidat, ciblant un antigène exprimé par des tumeurs, a été généré. Il vise à induire des réponses immunitaires spécifiques de cellules tumorales et à stimuler les défenses naturelles de l'organisme. Le développement clinique du candidat prévoit de le combiner avec la chimiothérapie. Le projet se propose d'explorer dans des modèles murins les combinaisons du candidat avec la chimiothérapie. 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.

La première question abordée sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des combinaisons du candidat avec la chimiothérapie dans des modèles murins du cancer. Le rôle de globules blancs particuliers, par ailleurs stimulé par le candidat, dans l'activité de la chimiothérapie seul, sera ensuite analysé. Dans une troisième partie, l'antigène ciblé ayant la propriété de participer de manière indirecte à des phénomènes d'immunosuppression, il sera investigué si la présence de l'antigène cible dans les modèles expérimentaux participe à cette inhibition du système immunitaire en quantifiant le nombre de cellules immunosuppressives au niveau de la tumeur ainsi que dans le sang et la rate. Enfin, l'effet du traitement par la chimiothérapie sur les proportions de cellules immunosuppressives sera analysé. Le nombre d'animaux par groupes expérimentaux varie entre 5, 10 et 20 en fonction du type de procédure afin d'optimiser le nombre d'animaux, avec au minimum une reproduction de la procédure. Un nombre maximal de 1500 animaux est envisagé pour ce projet. L'emploi d'animaux s'impose du fait de l'absence de méthode substitutive in vitro pour générer des réponses immunitaires et par les propriétés de la chimiothérapie capable d'interagir avec le système immunitaire et susceptible également de modifier des phénomènes physiologiques important pour la tumeur telle que la fabrication des vaisseaux sanguins. Les résultats issus de ce projet permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'activité du candidat en association avec la chimiothérapie.

53- Le cancer pancréatique est un des cancers les plus agressifs. Le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 3%, et la plupart des patients atteints de cancer du pancréas décèdent dans les 6 mois suivant le diagnostic. Ce mauvais pronostic s'explique par l'incapacité de diagnostiquer ce cancer à un stade précoce. Dès l'apparition des symptômes la tumeur est à un stade déjà très avancé et métastatique ce qui rend impossible tout traitement. Un certain nombre de facteurs sont plus ou moins considérés comme favorisant les risques d'apparition d'un cancer du pancréas comme l'âge, le tabac, l'obésité et le diabète. Mais les facteurs de risques les plus fréquemment corrélés avec ce cancer sont les altérations génétiques ainsi que la pancréatite chronique.

Des observations morphologiques, cliniques et génétiques ont permis de montrer un modèle de progression des lésions précancéreuses vers l'adénocarcinome et l'implication de l'altération de plusieurs gènes tels que K-Ras, p16, p53, BRCA2 a pu être mise en évidence. Cependant ces observations n'ont pas permis d'éclaircir le mécanisme de ce cancer du fait de l'implication de ces différents gènes dans de nombreuses voies de signalisation.

Des modèles in vivo génétiquement modifiés ont été créés afin d'étudier ces altérations génétiques ainsi que pour caractériser les différents stades précoces de développement du cancer du pancréas chez la souris que l'on ne peut observer chez l'homme en raison du diagnostic tardif. L'objectif final est de mettre en place des stratégies permettant d'avancer le diagnostic en

identifiant des marqueurs précoces du cancer du pancréas ainsi que l'identification de cibles thérapeutiques pour lutter contre celui.

Dans ce projet nous utiliserons les modèles Pdx1-cre/Kras^{G12D} et Pdx1-cre/Kras^{G12D}/INK4A^{F/F} déjà connus dans la littérature et expérimentés au laboratoire, ce qui représente au total 120 animaux. Le premier modèle permet le développement de lésions précoces du pancréas appelées Pan-IN n'aboutissant pas à un phénotype dommageable pour la souris. Le second modèle permet le développement d'un adénocarcinome pancréatique induisant la mort des souris aux alentours de la 9^{ème} semaine. La tumeur est histologiquement plutôt homogène contrairement à d'autres modèles murins de cancer pancréatique tel que les souris TAp73^{-/-}/Pdx1-cre/Kras^{G12D}/INK4A^{F/F}.

Il est connu que de nombreuses cellules immunitaires sont infiltrées dans les lésions pré-tumorales et les tumeurs (microenvironnement), c'est le cas des mastocytes pour lesquels nous souhaitons déterminer leur rôle pro ou anti tumoral.

Aussi lors des études cliniques déjà réalisées pour le Masitinib il a été observé que le traitement était efficace chez les patients pour lesquels le niveau de douleur était important. Nous souhaitons donc pour le second modèle scorer le niveau de douleur chez la souris pour voir si la corrélation observée chez l'homme dans la première étude clinique est réelle et savoir si on peut associer le traitement au Masitinib aux douleurs neuropathiques associées aux adénocarcinomes pancréatiques. Ainsi, nous observerons, sur ces animaux, l'infiltration des mastocytes dans l'hippocampe, car c'est un processus reconnu des mastocytes en association avec les phénomènes de douleur.

54- Les chondrosarcomes sont des tumeurs osseuses malignes qui arrivent en deuxième position des tumeurs osseuses primitives après les ostéosarcomes. Actuellement aucun traitement adjuvant n'a fait la preuve de son efficacité et le traitement des chondrosarcomes se limite essentiellement à l'exérèse chirurgicale large de la tumeur avec des risques de récurrence. Le taux de survie à 10 ans des patients atteints de chondrosarcomes n'a pas montré d'amélioration significative au cours des dernières décennies. Ainsi, il y a un besoin évident de développer de nouvelles thérapies ciblées à fort impact sur le chondrosarcome.

Plusieurs études ont montré que l'activation constitutive des voies de signalisation PI3K/AKT et MEK/ERK dans le chondrosarcome joue un rôle de premier plan dans la promotion de la croissance tumorale et dans la prévention de l'apoptose. Nos résultats récents ont permis de montrer la présence d'une activation aberrante des récepteurs FGFR et IGFR qui contrôlent les voies en aval PI3K/AKT et MEK/ERK dans le chondrosarcome. Ainsi, les stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs FGFR et IGFR conduit à l'inactivation de ces deux voies de signalisation et par conséquent à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et à l'augmentation de la mort cellulaire.

L'objectif principal du projet est d'évaluer l'effet antitumoral des inhibiteurs des récepteurs FGFR et IGFR, le PD173074 et le NVP-AEW541, respectivement dans des modèles de xélogreffe chez la souris nude. Ce modèle est couramment utilisé en cancérologie dans des études précliniques : il permet l'implantation et la croissance de cellules cancéreuses d'origine humaine chez la souris immuno-déficiente et par conséquent l'observation de l'évolution des tumeurs in vivo avant et après traitement par les inhibiteurs. Remplacer: cette étape animale est cruciale pour l'évaluation préclinique de l'efficacité de l'inhibition des récepteurs FGFR et IGFR sur la progression tumorale des chondrosarcomes in vivo.

Pour cette étude pilote, 4 groupes d'animaux (n=8 par groupe, soit 32 souris) seront constitués (réduire: n=8 pour diminuer la variabilité, données de la littérature) :

- 1) Tumeur induite avec le chondrosarcome SW1353 qui va servir de témoin
- 2) Tumeur induite avec le chondrosarcome SW1353 et traitée avec le PD173074 (inhibiteur du récepteur au FGF)
- 3) Tumeur induite avec le chondrosarcome SW1353 et traitée avec le NVP-AEW541 (inhibiteur du récepteur à l'IGF)
- 4) Tumeur induite avec le chondrosarcome SW1353 et traitée avec le PD173074 (inhibiteur du récepteur au FGF) et le NVP-AEW541 (inhibiteur du récepteur à l'IGF).

Ce travail devrait permettre de fournir aux cancérologues des marqueurs de transformation tumorale chondrocytaire et de nouvelles cibles dans le traitement des chondrosarcomes, susceptibles de déboucher sur des solutions thérapeutiques.

Raffiner: tout au long de l'expérimentation les animaux sont surveillés quotidiennement (antalgie au besoin, gavage, pesée, absence de points limites, ...) pour vérifier leur état de bien-être.

55- Même si l'arthrose est aujourd'hui un problème de santé publique majeur du fait de l'allongement de la durée de vie et de l'incidence croissante de l'obésité, il n'existe pas actuellement de prise en charge globalement satisfaisante des lésions dégénératives du cartilage. Ralentir le développement de l'arthrose constitue donc un enjeu majeur et repose sur l'identification des acteurs responsables des modifications du cartilage articulaire. Récemment, une nouvelle approche de la maladie arthrosique a été proposée en se basant sur les liens qui existent entre l'obésité et l'arthrose.

L'obésité est en effet un facteur de risque bien connu de cette arthropathie et peut contribuer à la maladie par le biais de nombreux facteurs inflammatoires produits par le tissu adipeux. L'articulation du genou contient le tissu adipeux de Hoffa susceptible d'interagir avec le cartilage. Le projet de recherche proposé vise à mettre en évidence la contribution du tissu adipeux de Hoffa au processus dégénératif dans l'arthrose.

L'étude chez l'animal, tout particulièrement le rat lors d'un modèle d'arthrose expérimentale, permet d'examiner toutes les phases de développement de la maladie tout en considérant l'ensemble de l'articulation et les interactions entre les différents tissus, ce qui est impossible dans un modèle cellulaire (remplace).

Nous envisageons donc d'étudier chez le rat l'effet d'une résection de ce tissu adipeux sur le développement et la progression d'une arthrose expérimentale induite par l'injection intra-articulaire de mono-iodo-acétate (MIA). Nos travaux antérieurs ont montré que ce modèle induit rapidement des modifications comparables à celles rencontrées chez l'homme avec notamment une érosion progressive du cartilage et une altération de la fonction articulaire (remplace). Ce modèle présente l'avantage d'être

reproductible et de sévérité variable selon la dose de MIA administrée. Les conditions d'hébergement, de soin et les méthodes utilisées (anesthésie, antalgie, sacrifice) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffiner). Le nombre d'animaux a été calculé d'après notre expérience du modèle, et l'induction bilatérale de l'arthrose permet de diminuer par 2 le nombre d'animaux étudiés (réduire). L'examen quotidien des animaux permettra de dépister une éventuelle infection, voire des points limites, exceptionnels dans ce modèle (raffiner). Deux semaines après la résection du tissu adipeux de Hoffa, une arthrose expérimentale sera induite par une injection intra-articulaire bilatérale de MIA. Les 2 genoux seront induits pour réduire le nombre de rats. Les animaux contrôle suivront un protocole opératoire identique mais sans l'ablation du tissu de Hoffa. Une injection de sérum physiologique sera effectuée pour les groupes de rats sains ayant subi ou non la résection du tissu de Hoffa. Les genoux entiers seront ensuite prélevés à des temps clés du développement de l'arthrose (J20, J30, J45 et J60) en vue d'une analyse histologique qui permettra d'évaluer la sévérité des atteintes articulaires. Le total des animaux utilisés sera ainsi de 80 rats (soit 160 genoux étudiés).

Une meilleure compréhension du rôle du tissu adipeux de Hoffa dans la dégénérescence du cartilage articulaire devrait permettre de mieux expliquer les liens entre l'obésité et l'arthrose et de poser les bases physiopathologiques nécessaires au développement de nouvelles options thérapeutiques pour le traitement de cette maladie douloureuse et invalidante.

56- Depuis l'époque de Pasteur, on peut définir 3 générations de vaccins: Les vaccins vivants atténués, inactivés ou tués qui consistent, comme leur nom l'indique, à injecter les pathogènes atténués, inactivés ou tués en vue d'induire une réponse immunitaire permettant à l'organisme de se défendre en cas de contact ultérieur avec le pathogène vivant. Les vaccins sous unitaires qui, plutôt que d'être constitués par les agents pathogènes en entier, sont composés uniquement d'antigènes spécifiques, généralement présents à la surface des pathogènes. Enfin les vaccins géniques qui consistent à introduire directement dans certaines cellules de l'organisme le gène codant l'antigène. L'antigène vaccinal est alors produit localement, sous sa forme native, par l'organisme de l'individu à immuniser et est donc en tout point similaire à l'antigène synthétisé lors d'une infection

Les vaccins géniques représentent donc les vaccins de demain de par leurs nombreux avantages: simplicité de mise en œuvre, peu coûteux, vaccination multi épitopes, chaîne du froid non obligatoire, profil sécuritaire important ... Néanmoins, jusqu'à présent, si les premiers essais chez l'homme ont permis de démontrer que les vaccins géniques étaient bien tolérés et sûrs ils ont échoué à montrer l'induction d'une réponse immunitaire efficace. Ils nécessitent, en outre, des quantités d'acides nucléiques très importantes. Pour permettre leur développement, des stratégies d'optimisation ainsi que des adjuvants sont nécessaires, afin d'améliorer la réponse immunitaire tout en continuant à décrypter les mécanismes mis en jeu lors de la vaccination génique.

Des vecteurs (un type d'adjuvant) ont été développés afin d'améliorer de manière très importante le transfert de ces acides nucléiques au sein des cellules tout en diminuant fortement la quantité d'acides nucléiques nécessaires. Certains de ces vecteurs ont déjà démontré leur efficacité, notamment dans le cadre de vaccins à ADN prophylactiques et thérapeutiques. Néanmoins, une nouvelle approche reposant sur l'utilisation d'ARN en lieu et place de l'ADN, est apparue et suscite un intérêt croissant de par son meilleur profil sécuritaire (pas de risque d'intégration génomique) que l'ADN.

Cependant, de la même manière que pour l'ADN, ces ARN passent très difficilement la membrane des cellules et des vecteurs sont nécessaires afin d'améliorer leur transport dans le cytoplasme de celles-ci. Nous avons déjà pu identifier, grâce à des mesures d'expression, certains vecteurs et par là même en éliminer un certain nombre. Il nous faut maintenant évaluer leur efficacité en termes de stimulation du système immunitaire et plus particulièrement du système immunitaire inné. Pour cela, il nous faut impérativement travailler sur un modèle animal et c'est pourquoi nous désirons injecter des souris (après anesthésie) avec ces vecteurs et observer à différents temps et dans différents tissus la modification des paramètres biologiques d'intérêt. Afin de réduire le nombre de souris au maximum (310 souris au total), nous prélèverons sur chaque animal les différents tissus testés (plutôt que de prélever uniquement un seul tissu par animal et d'augmenter le nombre nécessaire d'autant). Les prélèvements réalisés n'étant pas compatibles avec la survie des souris, celles-ci seront anesthésiées puis euthanasiées avant d'être prélevées.

57- Depuis l'émergence de la toxoplasmose cérébrale chez les Sidéens, il est apparu indispensable de rechercher les composants moléculaires intervenant dans le contrôle de l'infection chronique afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes, l'enkystement et la réactivation de l'infection. Les objectifs principaux de nos travaux sont donc d'élucider d'une part les mécanismes moléculaires impliqués d'une part dans la régulation des gènes et la biogenèse des organites apicaux sécrétoires qui jouent un rôle déterminant dans la virulence parasitaire, l'invasion et la modulation des réponses immunes de l'hôte infecté, et d'autre part dans la différenciation du tachyzoïte en bradyzoïte ou dans la réactivation des formes latentes bradyzoïtes en formes virulentes tachyzoïtes afin de restaurer, à terme, une résistance à *T. gondii* chez ces patients immunodéprimés, ou d'éliminer par chimiothérapie les kystes toxoplasmiques.

Nos études visent à élucider les fonctions biologiques de facteurs nucléaires et cytoplasmiques originaux et spécifiques de *T. gondii*. Le dénominateur commun de nos recherches est la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse des organites apicaux qui sont responsables de la virulence, de la différenciation parasitaire et du tropisme parasitaire pour le cerveau.

Nous utilisons principalement des techniques de cultures cellulaires qui suffisent pour un grand nombre de nos investigations. L'étude des mécanismes de prolifération et d'invasion sont possibles par l'utilisation de ces techniques *in vitro* permettant ainsi de substituer l'utilisation d'animaux vivants. Cependant, il n'existe aucun modèle de cultures cellulaires pour générer des kystes matures qui pourraient ressembler aux kystes isolés du cerveau de souris. Donc, il y a une nécessité absolue de produire ces

kystes dans les cerveaux de souris. De plus, la physiopathologie et le tropisme pour les différents organes en comparant différentes souches du toxoplasme ne peut se faire que chez la souris.

Le recours à l'utilisation d'animaux est donc substitué ou minimisé autant que nous le permettent d'autres investigations. De plus, lorsque l'utilisation d'animaux vivants est obligatoire, l'utilisation d'anesthésiques permettant de limiter la souffrance et le stress de l'animal est alors utilisée si toutefois cette procédure ne perturbe pas la véracité et la reproductibilité des résultats.

Ainsi, environ 15 rats (de souche Wistar) seront utilisés pour la production d'anticorps polyclonaux, en moyenne 3 anticorps polyclonaux sont produits par an. Ces anticorps sont dirigés contre des protéines parasitaires, soit 15 rats au total pour l'ensemble du projet sur 5 ans. De même, la production d'anticorps polyclonaux chez des souris nécessite l'utilisation d'environ 20 souris par ans, soit 4 souris immunisées contre une même protéine pour 5 protéines parasitaires par an (au total 100 souris).

Environ 450 souris seront utilisées afin de réaliser de l'imagerie par bioluminescence sur l'ensemble du projet.

L'étude des fonctions biologiques impliquées dans la différenciation de stade monopolisera environ 400 souris.

Enfin, environ 800 souris seront utilisées afin d'étudier des fonctions biologiques de facteurs nucléaires, cytoplasmiques et des organites apicaux chez *Toxoplasma gondii*. Les souris utilisées sont de souche BALB/C ou C57BL/6. Le calcul de l'effectif nécessaire se fait au préalable en fonction des paramètres de l'expérimentation ainsi que des tests statistiques qui seront utilisés. Ce calcul préalable de la Puissance du test (grâce à l'utilisation d'un utilitaire Excel disponible sur le site anastats.fr), nous permet de réduire l'effectif nécessaire au minimum.

Nous utilisons le test statistique de Mann-Whitney pour les courbes de survie des souris puis « GraphPad software », "Student's et Bonferroni test" pour nos analyses statistiques.

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

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu décryptés. Il existe deux formes de DMLA: atrophique et exsudative. La forme atrophique ou «sèche» est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-réiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la forme humide.

Pour trouver de nouveaux traitements efficaces et préventifs, nous devons comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la DMLA. L'étude des souris déficientes pour la thrombospondine 1 (TSP1) ou ses récepteurs CD36 et CD47 dans nos modèles murins aigus et au cours du temps nous permettra de mieux comprendre le rôle de cette voie de signalisation originale dans le développement de la maladie. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sur 3 ans sera de 270 souris.

La dégénérescence rétinienne par illumination est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être modélisée dans des systèmes *in vitro*. La photocoagulation Laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour « mimer » la DMLA exsudative et est aussi la résultante d'interactions complexes entre différents types cellulaires

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié des animaleries.

Toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple: agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages de stabulation.

59- La consommation nocive d'alcool entraîne chaque année 2,5 millions de décès. Plus de 20% des hommes présentent un risque de développer des troubles liés à la consommation d'alcool. Pour les femmes, ce risque est divisé par deux, de l'ordre de 8 à 10%. Les troubles liés à l'alcool sont communs dans tous les pays développés, avec une proportion plus faible mais néanmoins conséquente dans les pays en développement. Les troubles liés à l'alcool sont influencés par de multiples facteurs génétiques, environnementaux et comportementaux, ce qui rend difficile de trouver des marqueurs génétiques individuels pour aider à identifier les personnes à risque de développer ces troubles. Les études ont porté essentiellement sur des réseaux de gènes codant les composants permettant la communication neuronale. En dehors des effets sur le cerveau, le foie est un organe cible majeur des lésions induites par une consommation d'alcool, et il existe de plus une corrélation entre la consommation d'alcool et la cirrhose hépatique. Il est assez fréquent de retrouver une hyperhomocystéinémie, caractérisée par une augmentation d'homocystéine plasmatique, en cas d'alcoolisme chronique, essentiellement due à des problèmes hépatiques dérégulant le métabolisme de l'homocystéine. L'homocystéine est un acide aminé non incorporé dans les protéines. Cette hyperhomocystéinémie se caractérise également par la diminution de la protéine Dyrk1a, une protéine qui présente des propriétés anti-inflammatoires, dans le foie. Nos différents travaux suggèrent un rôle protecteur de la protéine Dyrk1a sur l'inflammation du foie. Or l'inflammation est une des causes majeures de l'apparition des troubles au niveau du foie liés à la consommation d'alcool. Les maladies alcooliques du foie sont des phénotypes complexes impliquant de nombreux facteurs génétiques. C'est pourquoi, notre programme de recherche vise à démontrer si une augmentation de la protéine Dyrk1a au niveau du foie pourrait protéger de l'apparition des troubles hépatiques due à une consommation d'alcool. Pour cela, des souris présentant différentes quantités de protéines Dyrk1a dans le foie seront soumises à un régime liquide contenant de l'éthanol à 5% ou à un régime possédant les mêmes calories mais sans éthanol qui servira de témoin. L'ensemble de notre étude est à la base de la recherche de facteur de risque afin de caractériser par la suite des populations à risque.

Comme il n'existe pas de méthodes alternatives utilisant des modèles cellulaires pour étudier les maladies alcooliques du foie, nous utiliserons une lignée de souris au stade adulte présentant une diminution hépatique de Dyrk1a et une lignée de souris au stade adulte présentant une augmentation, toutes deux comparées à leur témoin respectif.

Notre étude nécessitera donc 4 groupes de 20 souris, soit 80 souris. L'étude statistique utilisée nécessitera 5 souris par groupe de souris afin d'effectuer un test ANOVA suivi d'un test à posteriori pour comparer les groupes entre eux. Nous avons deux prélèvements de foie pour des études *in vitro* et *ex vivo*, ce qui demande deux fois plus d'animaux. Les animaux seront surveillés de façon journalière afin de vérifier si il n'y a pas de perte de poids au-delà de 15%.

60- La maladie ou syndrome de Sanfilippo A est une mucopolysaccharidose de type IIIA (MPS-III A). C'est une maladie génétique rare, neurodégénérative qui résulte de la déficience d'une enzyme : la sulfamidase. Cette maladie se manifeste par l'accumulation de glycosaminoglycane dans tous les organes et des désordres neurologiques sévères au niveau du cerveau.

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement sûr et efficace pour cette maladie qui conduit au décès des patients entre 10 et 20 ans. Le principal objectif de notre projet vise à développer une approche de type thérapie génique non virale qui consiste en la transfection des cellules de foie avec un plasmide biosécurisé (dépourvu de gène de résistance à un antibiotique) et de petite taille, contenant l'ADNc du gène SGSH murin qui code la sulfamidase. Le foie est utilisé comme organe sécréteur de cette enzyme recombinante. Des études précédentes nous ont permis d'obtenir une sécrétion élevée, durable et non toxique de la protéine exprimée. Après reconnaissance de l'enzyme circulante par des récepteurs spécifiques présents à la surface des autres cellules de l'organisme, la sulfamidase est recaptée, permettant ainsi une correction des niveaux de GAGs dans les organes autres que le foie (cœur, reins, poumons, rate, ...).

Dans un moindre degré, une correction est observée dans le cerveau ; cette faible correction est due à un passage restreint de la protéine à travers la barrière hématoencéphalique (ou BHE). Celle-ci représente en effet un filtre extrêmement sélectif, protégeant ainsi le cerveau, mais qui complique le traitement médicamenteux d'un grand nombre de maladies neurologiques.

C'est pourquoi, notre étude va consister à fusionner notre protéine d'intérêt à différents peptides reconnus par des récepteurs de la BHE, visant à obtenir une activité sulfamidase plus importante et une meilleure correction du taux de GAGs dans le cerveau. De nombreux articles décrivent de tels peptides. Cependant, dans un souci de réduction et de raffinement, nous avons mis en place des expériences *in vitro* (transfection d'hépatocytes) qui nous permettent de valider nos constructions avant l'administration à des souris. Ce premier criblage permet donc de réduire de manière significative le nombre d'animaux. Cependant, il est à présent indispensable d'évaluer la biodistribution (présence éventuelle dans le cerveau) chez l'animal après sécrétion des protéines par le foie. Notre approche expérimentale nécessite donc l'utilisation d'animaux tels que la souris. De plus, les modèles *in vitro* couramment utilisés pour tester le passage de la BHE ne peuvent être utilisés car ils excluent l'évaluation du caractère immunogène des protéines de fusion générées. En utilisant un nombre de souris approprié (le plus faible possible mais permettant une interprétation fiable et statistique des résultats, $n=10/\text{lot}$, 4 lots comprenant 4 protéines de fusion à tester et 1 lot pour notre protéine de référence: $4+1 \times 10 = 50$ souris), notre projet permettra d'évaluer une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de cette maladie.

61- Les zygomycoses sont des mycoses opportunistes qui concernent les patients immunodéprimés, diabétiques ou ayant des facteurs de risque de développement de pathologies infectieuses opportunistes. Ces zygomycoses sont particulièrement difficiles à traiter du fait notamment du terrain du patient mais aussi du faible nombre de molécules efficaces.

Notre équipe de recherche développe, depuis plus de 10 ans, de nouveaux antifongiques. Certains ont montré une excellente activité comme anti-Candida et anti-aspergillaire *in vitro* mais aussi dans les modèles murins correspondants. De plus, certaines ont montré une activité *in vitro* sur certains genres appartenant aux zygomycètes, en particulier Rhizomucor sp.. Afin de confirmer *in vivo* ces résultats prometteurs, nous voulons développer au laboratoire un modèle murin de zygomycose à Rhizomucor sp. Pour atteindre notre objectif, nous avons estimé que 64 animaux sont nécessaires pour mener à bien notre étude.

Cette pathologie infectieuse entraînera obligatoirement l'apparition de signes cliniques marqués chez l'animal (moindre mobilité voire immobilité, cachexie, déficit moteur). Les points limites sont définis par l'apparition de ces signes cliniques. Les animaux atteignant un point limite sont euthanasiés.

62- L'antithrombine (AT) est une molécule anticoagulante présente de manière naturelle dans le corps humain. Elle possède également des effets anti inflammatoires. L'injection de cette molécule comme médicament a été testée chez des patients atteints d'infection sévère (sepsis) afin de moduler l'inflammation. Malheureusement, du fait du caractère anticoagulant de l'AT, les effets hémorragiques indésirables ont surpassé les effets bénéfiques anti inflammatoires. L'AT n'est donc pas actuellement utilisée en pratique.

Cependant, le développement de molécules d'AT mutées, c'est à dire dont l'effet anticoagulant a été supprimé, mais dont l'activité anti inflammatoire est préservée pourrait apporter un espoir de traitement dans les infections sévères.

Notre étude animale vise à tester différentes formes d'AT, normales et mutantes, sur des animaux atteints de sepsis afin de sélectionner la forme la plus favorable à un éventuel essai chez l'homme.

Le développement de molécules destinées à l'homme in fine passe impérativement par une étape animale *in vivo* après les études *in vitro* ou *ex vivo*. En effet seule l'étude des molécules d'intérêt sur un modèle « intégré » approchant au mieux toute la 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.

Ainsi, dans notre étude, nous allons utiliser différentes formes d'antithrombine (AT) natives recombinantes (5 formes natives) et mutées recombinantes (10 formes mutées) dont les effets anticoagulants auront été atténués par la modification du site de fixation sur les facteurs de la coagulation X et IIa.

Les objectifs de ce protocole seront:

- Déterminer la cinétique dans le sang des différentes formes d'antithrombines chez la souris après injection unique.
- Comparer les effets des antithrombines natives et mutées sur la survie et l'inflammation au cours du sepsis chez la souris.

Des souris Swiss mâles seront utilisées (au total 955 souris). Dans une première série expérimentale l'étude de la cinétique de la concentration plasmatique des différentes formes d'AT après injection unique d'une dose de 500 ui/kg sera réalisée. Pour chaque forme, 21 souris seront injectées (soit 315 souris) et prélevées respectivement à 30 minutes (7 souris), 2 heures (7 souris) et 6 heures (7 souris) après l'injection. Le taux d'AT dans le sang sera mesuré. Compte tenu des perturbations physiologiques entraînées par l'AT elle-même et par les procédures d'injection et de prélèvement, ces animaux ne pourront pas être utilisés pour les autres séries expérimentales portant sur le sepsis.

Dans une deuxième série expérimentale, l'impact des différentes formes d'AT sur la survie au cours du sepsis (induit par une petite plaie du tube digestive entraînant une péritonite) sera analysé. 20 animaux seront analysés par forme d'antithrombine plus 20 animaux témoins (soit 320 souris). L'expérimentation n'ira pas jusqu'au décès lié au sepsis mais sera interrompue à des points limites (signe d'infection sévère) prédéfinis où les animaux seront euthanasiés.

Dans une troisième série expérimentale, l'impact des différentes formes d'AT sur des paramètres plasmatiques et tissulaires de l'inflammation au cours d'un sepsis sera étudié. Vingt animaux seront analysés par forme d'antithrombine plus 20 animaux témoins (soit 320 souris). Huit heures après l'induction du sepsis, le sang, puis après euthanasie, les reins et les poumons des animaux seront prélevés pour analyses des paramètres de l'inflammation.

Pour ces études sur modèles septiques, la constitution de groupes de 20 animaux pour chaque forme d'AT est justifiée par la variabilité importante induite par le sepsis augmentant de manière importante les écarts types pour chaque variable étudiée. Un nombre suffisant d'animaux est donc requis. L'établissement de courbe de survie sur 20 animaux est une pratique usuelle dans la littérature scientifique.

Résultats attendus: Cette étape permettra de déterminer les formes d'AT les plus favorables à un développement ultérieur en vue d'une utilisation humaine.

63- Dans une étude de 2005, l'European Brain Council a estimé à 127 millions le nombre d'européens atteints d'une affection du système nerveux central (SNC), comprenant les troubles psychiatriques et neurologiques, soit un quart de la population. En outre, le coût annuel pour traiter ces troubles cérébraux est estimé à 386 milliards d'euros en 2004. Ces exemples reflètent le besoin de la population européenne et met en évidence la nécessité de développer des médicaments dirigés sur les affections du SNC.

Une faible biodisponibilité cérébrale est connue pour être un obstacle majeur au développement d'une nouvelle molécule thérapeutique. Pourtant, les informations sur la biodisponibilité et la pharmacocinétique (PK) cérébrale ne sont souvent connues que tardivement et de manière incomplète dans le processus de développement d'un médicament, faute de modèles adaptés.

Différents techniques ex vivo existent (indice d'absorption cérébrale, clairance d'absorption cérébrale, ratio homogénéité cérébral/plasma, autoradiographie quantitative). Ces dernières sont majoritairement réalisées sur des rongeurs et permettent d'avoir des notions sur la biodisponibilité cérébrale et sur le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) mais ne permettent pas de réaliser des pharmacocinétiques dans un compartiment physiologique.

Pour ce faire, il existe des méthodes in vivo d'imagerie, Tomographie par Emission de Positrons (TEP) ou émission simple de photons (SPECT), de microanalyse intracérébrale et de ponctions de liquide céphalorachidien (LCR). Les méthodes d'imagerie offrent des avantages mais sont complexes, coûteuses et peu adaptées aux besoins des industriels développant de nouvelles molécules thérapeutiques.

Actuellement, les industries pharmaceutiques ont une capacité limitée à générer des données sur la biodisponibilité cérébrale. En effet, il y a un manque de modèles précliniques disponibles et les informations fournies par des ponctions de LCR lombaires, réalisées en clinique ou préclinique, sont limitées.

Ainsi, afin de répondre aux besoins des équipes développant de nouveaux médicaments, nous proposons des modèles pertinents, abordables et uniques. Ces modèles s'appuient sur la pertinence du modèle primate vis à vis du SNC et sur différentes techniques d'échantillonnages. En effet, la PK cérébrale peut être réalisée soit par la microdialyse intracérébrale, technique permettant d'avoir accès à la fraction pharmacologiquement active au site d'action par diffusion passive du composé au travers d'une membrane. Soit par des ponctions de LCR, techniquement plus accessible que la microdialyse. La ponction de LCR peut se faire sur animal vigile, via un dispositif médical préalablement implanté dans les ventricules cérébraux ou par ponction occipitale, sur animal anesthésié.

Tous les actes techniques (prélèvements sanguins, entraînement à la contention, prévention de la douleur, ...) sont rédigés sous forme de modes opératoires.

Au cours des 5 années du projet, il est prévu d'utiliser 60 macaques afin déterminer la PK de futurs médicaments destinés à traiter des affections du SNC comme les maladies neurodégénératives ou les cancers cérébraux.

64- Jusqu'à maintenant, la seule façon d'induire une activité cérébrale artificiellement était la stimulation électrique (couplage neuro-électrique). Cette technique rend d'énormes services (i.e. maladie de parkinson, épilepsie). Cependant ceci nécessite la pose d'électrodes sur le cortex (électrodes sous durales) ou dans le parenchyme cérébral lui-même (électrodes profondes), ce qui constitue une invasivité certaine, une précision faible (tache focale de 5mm minimum), une stimulation en simple 2D, une

efficacité dépendante de l'emplacement irrémédiable de l'électrode, et une efficacité qui risque de diminuer avec le temps compte tenu des mouvements cérébraux et de la gliose réactionnelle au niveau des contacts électriques.

Des expérimentations faites tout récemment ont prouvé qu'il était possible de stimuler le cerveau de rat de façon diffuse par des ultrasons, avec des paramètres ultrasonores précis.

Nous souhaitons apporter des éléments supplémentaires pour prouver qu'il est possible d'activer le cortex cérébral de façon sélective sur des plus gros animaux par un champ ultrasonore à tache focale réduite, et ce de façon répétée, sans induire de toxicité cellulaire. Le but est de mettre en place une interface brain-machine totalement nouvelle, plus précise et sans contact.

Ce programme de recherche a donc pour but de montrer que les ultrasons pulsés de faible intensité, émis au contact de la dure-mère et/ou du cerveau sont capables d'induire une activation cérébrale suffisante pour engendrer de façon répétée une fonction spécifique (i.e. motrice), et ce de façon répétée, sans effets indésirables ni souffrance neuronale.

Les prototypes élaborés dans le cadre de ce projet, dimensionnés de manière à émettre une stimulation ultrasonore avec tache focale minimale, ont été caractérisés *in silico*, puis *in vitro*. Ils remplissent en théorie les conditions pour pouvoir engendrer une activation neuronale.

Nous souhaitons maintenant tester les dispositifs *in vivo* sur 6 à 10 lapins de Nouvelle-Zélande, animaux fréquemment utilisés en recherche dans les protocoles d'étude des ultrasons à usage thérapeutique sur le cerveau. Il sera ainsi possible de limiter le nombre d'essais et de réaliser ces derniers dans des conditions optimales pour l'animal.

La stimulation du cortex moteur par Ultrasons Pulsés de Faible Intensité sera réalisée sous anesthésie générale, après craniotomie. La souffrance des animaux pour lesquels un suivi comportemental sera effectué - due à l'incision du scalp et à la craniotomie, procédures peu douloureuses chez l'Homme - sera traitée par l'administration d'antalgiques post-opératoires.

65- Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent qui représente la première cause de mortalité des femmes par cancer de par le monde. La forte mortalité associée au cancer du sein est essentiellement liée au développement des métastases qui ne peut pas s'étudier *in vitro* et nécessite le développement et l'utilisation de modèles animaux. En effet, les phénomènes qui conduisent à la formation des métastases sont complexes et font intervenir de multiples paramètres et propriétés tels que l'invasion de la matrice extracellulaire, la survie et la distribution dans la circulation lymphatique/sanguine, la migration trans-endothéliale et la colonisation d'organes cibles à distance de la tumeur primaire.

Les canaux sodiques Nav sont des complexes de protéines membranaires (une sous-unité principale et une ou deux régulatrices) exprimés dans différents cancers épithéliaux en comparaison avec des tissus sains qui ne les expriment pas. L'expression de Nav1.5 dans des biopsies de cancer du sein est corrélée au développement de métastases et à une diminution de la survie des patientes. Nous avons montré que l'activité du canal Nav1.5 stimule l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses mammaires (*in vitro*). La sous-unité principale Nav1.5 Nav est associée à des sous-unités régulatrices 13, dont le rôle dans les cellules cancéreuses n'est pas caractérisé. Des études préliminaires montrent que les tumeurs mammaires expriment de façon différente les sous-unités auxiliaires 13, et que leur niveau d'expression pourrait être associé à un risque élevé de développer des métastases. Les sous-unités 13 pourraient moduler l'expression et l'activité de Nav1.5.

Les objectifs de ce projet de recherche sont de déterminer l'implication du canal Nav1.5 et de la sous-unité régulatrice $\beta 4$ des cellules cancéreuses mammaires humaines dans la croissance tumorale et le développement des métastases *in vivo*. Pour cela nous utiliserons deux modèles (déjà mis en place) de xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires humaines, génétiquement modifiées pour l'expression ou non des gènes d'intérêt, chez la souris immunodéprimée (240 NMRI nude et 48 SCID beige) afin de suivre au cours du temps la croissance tumorale et le développement métastatique. Ces expérimentations permettront de définir le rôle des protéines Nav1.5 et $\beta 4$ dans la progression cancéreuse et l'intérêt de leur ciblage pharmacologique (utilisation de nouvelles molécules synthétisées pour ce projet et comparaison avec des molécules existantes mais employées dans d'autres indications) pour de nouvelles stratégies anti-cancéreuses. Il n'existe pas de remplacement possible pour ces expérimentations qui répondent cependant aux exigences de réduction et de raffinement.

66- Depuis 2009, la plateforme animalerie réalise des prestations de service à façon dans le domaine de la cancérologie pour les équipes internes et/ou externes à l'université. Bien qu'elle dispose de plusieurs modèles murins de cancer humain, sa spécialité s'est orientée vers les modèles murins d'hémopathies malignes B humaines pour deux raisons:

- Le savoir-faire acquis en expérimentation animale par le personnel depuis de nombreuses années dans le domaine des maladies du sang

- La mise au point en 2006, dans le cadre d'un projet européen d'un modèle murin original de leucémie lymphoïde chronique (LLC), maladie pour laquelle aucun traitement hormis la chimiothérapie n'existe à l'heure actuelle.

Au cours des dix dernières années, l'imagerie directe de cellules vivantes est devenue un outil fondamental pour étudier des processus biologiques. L'objectif est de faire exprimer de façon stable, dans des lignées hématopoïétiques cancéreuses, une protéine bioluminescente qui nous offre la possibilité d'un suivi spatio-temporel en temps réel, de façon non invasive, directement au sein d'un organisme vivant, la souris. Le principe de suivi de lignées bioluminescentes *in vivo* a déjà été prouvé dans diverses pathologies.

La mise à disposition de ces lignées luminescentes présente plusieurs avantages. D'un point de vue scientifique, nous pourrons réaliser un suivi spatio-temporel en temps réel des cellules cancéreuses au sein d'une souris et apprécier l'efficacité de molécules thérapeutiques sur la machine d'imagerie présente dans l'animalerie. D'un point de vue éthique, la luminescence émise par les cellules cancéreuses permettra non seulement, de la localiser *in situ* dans l'animal mais également, d'apprécier en temps réel sa croissance. Nous pourrons ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés et éviter des sacrifices.

La plateforme a mis au point plusieurs lignées cancéreuses d'hémopathies malignes B humaines bioluminescentes. L'objectif de ce projet est de mettre au point le suivi de ces cellules par imagerie après injection chez la souris. Nous allons utiliser un nombre restreint d'animaux par groupe, 3 souris au départ par lignée cancéreuse, au nombre de 4, soit 12 animaux au total. Les expérimentations pourront être reproduites une ou deux fois en cas de résultats discordants dans la biodistribution des cellules. En conséquence, le nombre total d'animaux utilisé variera entre 12-36 animaux. L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

67- Le cancer gastrique est l'un des plus dévastateurs en raison d'un diagnostic souvent tardif et de l'absence de thérapies efficaces. Sa prévalence en région Bretagne fait partie des plus importantes au niveau national. L'association de docetaxel, un anticancéreux de la famille des taxanes, et de lovastatine, un hypocholestérolémiant majeur, a été évaluée sur des cellules gastriques cancéreuses in vitro dans un premier temps. Les résultats ont montré que les composés associés étaient capable d'induire la mort de cellules tumorales avec un effet supérieur à celui induit par chacun des composés seuls (Brevet, « Combination of a statin and a taxana for the treatment of solid tumor »).

L'objectif de ce projet est d'évaluer in vivo l'activité de ces deux composés seuls ou en association dans un modèle de tumeurs gastriques xénogreffées chez la souris nude.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 90, réparties en 9 lots de 10 souris nude.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées in vitro dans un premier temps, (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

68- Chez le mammifère adulte, une production continue de neurones existe tout au long de la vie qui se situe dans deux zones cérébrales, l'hippocampe et le bulbe olfactif. Le rôle de la neurogenèse olfactive dans les comportements est très peu connu. L'objectif général de ce projet est de comprendre dans quelle mesure la neurogenèse olfactive adulte, source de plasticité cérébrale, peut être un mécanisme par lequel l'olfaction contribue à la mise en place du comportement maternel. Cette expérience est entreprise chez les ovins car le comportement maternel de cette espèce est dépendant de l'olfaction. Les odeurs infantiles attirent la mère vers le nouveau-né et permettent sa reconnaissance de telle sorte qu'il est seul à être autorisé par la mère à téter. Nous évaluerons les effets du blocage de la neurogenèse olfactive sur la mise en place du comportement maternel à la parturition et la reconnaissance olfactive du jeune. Cette étude s'intéressant au comportement animal ne peut s'entreprendre que sur l'animal vivant et aucune méthode de remplacement comme une étude in vitro n'est envisageable. Trente-six brebis et 42 agneaux sont requis ce qui constitue un nombre minimum compte-tenu de la mise au point de la procédure expérimentale et des aléas expérimentaux. Toutes les mesures seront prises pour favoriser le bien-être des animaux notamment en préservant leur besoin d'être en contact avec leurs congénères et en leur apportant nourritures et soins ajustés à leur condition physiologique. De plus, une médication pré et post-opératoire adaptée permettra de supprimer le mal-être notamment en recourant à l'anesthésie et à l'analgésie.

69- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées en France. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées. Ce projet a pour but d'étudier l'une d'entre elles en examinant l'effet de l'injection d'une molécule phototoxique associée à une illumination sur le fonctionnement des cellules de la rétine. Ces expérimentations vont permettre de compléter les connaissances issues d'expériences sur cellules en culture. Ces dernières restent en effet imprécises dans la mesure où les cellules d'EPR ne se comportent pas de la même manière in vivo et in vitro. En effet, elles prolifèrent en culture et non dans l'œil. De plus, les tissus environnants vont avoir un rôle à jouer dans les effets observés, ce qu'il n'est pas possible de mesurer in vitro. Pour ces différentes raisons, il est nécessaire de réaliser ces tests chez l'animal. Ce projet sera réalisé sur un total de 118 rats. Dans ces expériences, le nombre de rats par groupe est réduit à 6, afin de permettre de tester si besoin, deux modes d'injection ainsi que trois durées d'illumination. En fonction des résultats obtenus lors des premières expériences, il sera éventuellement possible de réduire encore le nombre de rats si par exemple le premier mode d'injection convient. Pendant et après les expérimentations, les rats seront surveillés et traités pour anticiper ou soigner toute souffrance apparente liée à l'injection. Les rats seront maintenus à deux par cage pendant toute la durée de l'expérience et sacrifiés une ou deux semaines après la phase d'illumination. Le poids et l'apparence physique des rats seront vérifiés entre le jour de la manipulation et la fin du protocole. Une perte de poids supérieure à 20% ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des rats seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

70- Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche qui vise à identifier des nouvelles molécules permettant de traiter les maladies auto-immunes (sclérose en plaque, psoriasis, arthrites rhumatoïdes, inflammations chroniques intestinales) L'Encéphalomyélite Allergique Expérimentale (EAE) est utilisée pour modéliser divers aspects de la sclérose en plaques (SEP) chez les rongeurs et sert de modèle d'étude des maladies autoimmunes. La SEP est un trouble neurologique complexe qui se présente sous multiformes, et qui se produit chez les jeunes adultes. Ses symptômes comprennent l'inflammation, la

démyélinisation et la perte axonale. Les modèles animaux sont utilisés pour des recherches sur la physiopathologie de cette maladie, et servent à évaluer le potentiel des stratégies de protection ou de traitement qui comprennent par exemple: l'immuno-modulation, l'immuno-protection, la régénération axonale ou la réparation de la myéline.

Les caractéristiques multiformes-multiphases de scléroses multiples exigent que des modèles appropriés soient utilisés pour répondre à des questions spécifiques relatives aux différents stades de la maladie.

L'EAE consiste à orienter l'activité du système immunitaire propre de l'animal contre sa myéline, ce qui induit une inflammation du système nerveux central et l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique. Cela provoque un syndrome neurologique chez l'animal, qui est suivi par une reprise partielle au cours d'une première phase chronique de rémission, cette phase est associée à une inflammation et une démyélinisation réversible. C'est à ce stade que nos travaux présentent un intérêt. Après cela l'animal va entrer dans la forme progressive, qui est associée à la démyélinisation chronique et la perte axonale.

Au cours de ces différentes phases, il est possible d'évaluer différentes stratégies thérapeutiques. Nous avons fait le choix de focaliser nos travaux pendant la phase précoce et d'établir un modèle qui puisse nous permettre de développer notre stratégie d'immuno-modulation bien avant que les animaux n'entrent dans une phase sévère de la maladie.

Ce choix de stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude.

Notre projet consiste à intervenir sur l'immuno-modulation via une voie pharmacologique, réduisant de cette façon les phénomènes inflammatoires. Ce projet est constitué de différentes phases allant de l'implémentation dans notre laboratoire du modèle qui est très bien documenté dans la littérature, ce qui permet de réduire le nombre d'essais et par conséquent de minimiser le nombre d'animaux nécessaire au développement technologique, l'EAE une fois mise en place servira de modèle de criblage in vivo de molécules innovantes issues de la chimie médicinale. Il est crucial de préciser que notre stratégie consiste à développer un modèle de protection ou de retardement des effets délétères, c'est la raison pour laquelle nous envisageons de n'engager aucun animal dans des phases sévères de la pathologie.

Néanmoins le processus complexe de protection via l'immuno-modulation requiert le recours à l'animal

Ce projet n'engagera qu'une seule espèce animale (la souris) et dans un nombre limité, qui est estimé à moins de 1300 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de chaque procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés.

A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies auto-immunes, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

71- Le but de notre recherche est d'une part de tester l'effet du plomb et du zinc sur la valeur sélective des oiseaux inféodés au milieu urbain et d'autre part d'identifier le rôle de ces métaux traces dans le maintien du polymorphisme de couleur.

Nous soumettons 96 pigeons féroces urbains *Columba livia* maintenus en captivité en volière extérieure à 4 traitements expérimentaux:

Un groupe témoin non supplémenté en métaux

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) a été supplémentée en zinc

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) a été supplémentée en plomb

Un groupe dont l'eau (de boisson et de bain) a été supplémentée en zinc et en plomb

Nous examinons ensuite l'effet de ces traitements sur la masse corporelle, la performance reproductive, la réponse immunitaire et le stress oxydatif.

L'effet de ces métaux sera testé à la fois sur le système immunitaire humorale (acquis) grâce à l'injection de KLH, et sur le système immunitaire cellulaire (inné) grâce à une injection de PRA.

Dans le but d'appliquer au mieux la règle des trois R, le nombre d'individus utilisés a été réduit au maximum raisonnable (24 individus/traitement) pour pouvoir traiter statistiquement les résultats. Par ailleurs les procédures effectuées (prises de sang, injection de KLH et de PRA) sont bien connues et induisent une contrainte légère sur les animaux. Enfin les mêmes animaux seront utilisés durant tout le long de l'expérience et seront relâchés dans leur milieu naturel, en accord avec la mairie de Paris.

72- Nous voulons dans ce projet décrire les changements s'opérant dans l'organisation fonctionnelle des réseaux du cortex somatosensoriel primaire suite à un apprentissage associatif et décrire les mécanismes cellulaires de plasticité sous-jacents à cette réorganisation. La compréhension de ces mécanismes peut s'appuyer sur l'utilisation de modèles mutants et nous baserons une partie de nos expériences sur des souris modèles du syndrome de l'X Fragile, une maladie caractérisée entre autres par des déficits cognitifs. Notre modèle murin exprimera la pathologie dans le cortex somatosensoriel uniquement afin de tester les liens entre des défauts de fonctionnement de cette structure et des déficits cognitifs. Globalement, les résultats de notre étude nous permettront d'identifier des réseaux qui jouent un rôle dans l'apprentissage et d'identifier des mécanismes cellulaires nécessaires au bon déroulement de cet apprentissage. Ces mêmes mécanismes peuvent éventuellement devenir des cibles thérapeutiques.

Ce projet utilisera 800 souris mâles C57B16 et 2600 souris génétiquement modifiées, modèle de l'X Fragile, dans un fond C57B16, dont la moitié sera mâle et servira à la génération de données (la mutation de l'X Fragile se trouve sur le chromosome X).

Les souris présentent une organisation des réseaux corticaux sensoriels similaire à celle décrite chez l'homme. L'organisation des réseaux corticaux est fonction du développement du cortex, du fonctionnement d'autres régions sous-corticales ainsi que de l'expérience des individus. Elle ne peut donc pas être reproduite ni étudiée dans des modèles de cultures cellulaires in vitro.

Là où c'est possible, chaque souris servira à plusieurs mesures comportementales et/ou électrophysiologiques pour limiter le nombre d'animaux. Avant euthanasie, le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement via la mesure de leur poids et l'observation de leur aspect et comportement.

73- Les LPS sont des composants essentiels de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et font partie de la famille des endotoxines.

L'administration de LPS directement dans les voies aériennes de souris induit une inflammation de type neutrophilique, infiltrat inflammatoire proportionnel à la dose de LPS administrés. Ces modèles sont fréquemment utilisés dans le laboratoire avec une administration par voie intranasale. L'objectif ici est d'évaluer la localisation de l'infiltrat inflammatoire induit par l'administration de LPS par 2 voies différentes : intranasale ou intratrachéale ainsi que l'importance quantitative de cet infiltrat et la production de médiateurs inflammatoires selon la voie d'administration. La dose de 5 µg de LPS retenue pour ce protocole est une dose qui permet d'obtenir un infiltrat inflammatoire de type neutrophilique important dans les voies aériennes de souris (C57BL/6 et Balb/c) avec apparition d'un bronchospasme spontané environ 1h30 après administration par voie intranasale de LPS.

74- Issus de la famille des lymphocytes, des globules blancs/leucocytes particuliers, ont été récemment et progressivement reconnus comme des cellules clés i) contribuant au développement des tissus lymphoïdes, ii) contribuant, pendant la période post-natale, à l'établissement du microbiote symbiotique, puis à son homéostasie iii) prévenant la translocation de bactéries invasives. Le récepteur nucléaire ROR γ ^t a permis d'identifier une nouvelle famille de cellules lymphoïdes. Nous les désignons par le sigle «ROR γ ^t ILCs».

Un médiateur moléculaire, nommé l'interleukine-22 (IL-22), requise entre autres pour le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la paroi de l'intestin, est produit de façon constitutive par les ROR γ ^t ILCs. Le développement et l'activité des ROR γ ^t ILCs sont programmés, probablement afin d'anticiper et de contribuer à la colonisation intestinale par les symbiotes microbiens; en outre les ROR γ ^t ILCs sont également régulés par les symbiotes et par les remodelages tissulaires locaux qui opèrent au niveau des cellules épithéliales de la paroi intestinale et du chorion sous épithélial quand ces compartiments sont colonisés plus ou moins durablement par des microorganismes invasifs.

L'objectif de ce projet est i) d'identifier le type de microbes symbiotiques, ii) et de quelle manière, ces microbes agissent et régulent les ROR γ ^t ILCs, et comment ces cellules contrôlent le microbiote à l'homéostasie. Ce projet vise également à comprendre comment ce dialogue se détériore quand surviennent des processus inflammatoires, et à identifier des voies thérapeutiques qui rétabliront l'homéostasie et la santé.

Le développement de ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique n'a pas été ou a été génétiquement altéré.

Pour les quatre procédures qui seront mises en œuvre pour explorer et caractériser in vivo les propriétés des ROR γ ^t ILCs nous estimons à 1100 l'effectif de la population de différentes lignées de souris en expérimentation, ce, en mettant tout en œuvre pour minimiser l'inconfort et le mal être.

75- L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle du gène étudié chez l'adulte. En effet, des études précédentes ont montré une implication de ce gène dans les processus inflammatoires et il s'avère surexprimé dans certaines lignées cancéreuses humaines.

Le but du projet est donc de comprendre dans un premier temps l'impact de la suppression constitutive de ce gène sur l'état général de la souris. Puis dans un second temps, de procéder à une délétion plus ciblée, en utilisant une approche par croisement de lignées mutantes conditionnelles, ceci afin de déterminer plus précisément les tissus impliqués dans les phénotypes observés.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux chez qui les techniques de mutation génétique sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vivo ne peut remplacer le fonctionnement du système immunitaire et ses interactions avec l'organisme.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées (24 animaux seront donc utilisés pour un mutant constitutif (12 mutant et 12 contrôles), afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude.

Ces animaux seront soumis à une batterie de tests de phénotypage classiquement utilisée dans la recherche préclinique afin d'obtenir un ensemble de résultats permettant de déterminer l'impact de cette délétion sur les fonctions neurologiques majeures et sur l'état de santé de l'animal. Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

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

tenu de la nature diurne de la vie humaine, ces données ne peuvent pas être appliquées directement dans un contexte biomédical. Comprendre comment fonctionne le système circadien chez un rongeur diurne est donc une condition nécessaire pour des applications biomédicales appropriées.

Chez les animaux nocturnes, l'activité comportementale conduit à une suppression de l'activité électrique dans les noyaux suprachiasmatiques, siège de l'horloge principale des Mammifères. Le résultat de cette suppression est que l'amplitude du rythme de l'activité électrique des noyaux suprachiasmatiques est renforcée par l'activité de comportements de l'animal nocturne pendant la phase active du cycle.

Toutefois, si les animaux diurnes répondent à l'activité comportementale par une suppression de l'activité électrique des noyaux suprachiasmatiques, comme le font les animaux nocturnes, l'effet serait une réduction, plutôt qu'une amplification de l'amplitude de l'horloge, étant donné que les animaux diurnes sont actifs pendant le pic de l'activité électrique de l'horloge.

Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier un rongeur diurne, *Arvicanthis*. Plus précisément, nous allons enregistrer l'activité électrique dans les noyaux suprachiasmatiques chez 52 *Arvicanthis* exposés à 4 conditions différentes d'éclairage (pour modifier le fonctionnement de l'horloge suprachiasmatique). Nous nous attendons donc à ce que les effets de rétroaction de l'activité comportementale sur l'horloge principale soient opposés chez les espèces diurnes, c'est-à-dire qu'ils soient de nature excitatrice, plutôt qu'inhibitrice comme chez les rongeurs nocturnes.

77- En cancérologie cervico-faciale, il est parfois nécessaire de pratiquer une résection mandibulaire interruptrice. Le procédé de reconstruction de référence est le lambeau libre osseux revascularisé microanatomosé. Ce procédé n'est pas toujours réalisable. L'alternative est la mise en place d'une plaque d'ostéosynthèse qui s'avère parfois mal tolérée dans le temps et ne permet pas une réhabilitation dentaire. Le but du projet est de reconstruire un os naturel solide au niveau de la perte de substance de façon à permettre à terme l'ablation de la plaque d'ostéosynthèse et une réhabilitation dentaire. Lors de la mandibulectomie, la perte de substance osseuse est conservée par un conformateur en silicone. Une membrane dite induite se constitue autour de ce conformateur. Seize semaines après cette 1ère chirurgie, le conformateur est retiré et la membrane induite est comblée par un complexe ostéoinducteur, en l'occurrence une céramique biphasique phosphocalcique à laquelle sont ajoutés de la moelle osseuse totale autologue et de la simvastatine. La technique des membranes induites a déjà été utilisée avec succès dans la reconstruction du tibia et de la mandibule, mais avec un conformateur en ciment chirurgical polyméthylméthacrylate (PMMA) et comblément par de l'os autologue. Les avantages de ce projet sont: 1) l'utilisation d'un conformateur en silicone plus facile à retirer que le PMMA, 2) l'utilisation d'un complexe ostéoinducteur qui permet d'éviter le traumatisme et les séquelles d'un prélèvement abondant d'os autologue. La simvastatine a montré un effet ostéoblastique dans de nombreux travaux *in vitro* et *in vivo*, notamment à partir de cellules non différenciées de la moelle osseuse. Plusieurs études ont été réalisées préalablement chez le petit animal (rat Wistar, résultats non encore publiés). Ces expérimentations ont permis d'évaluer les qualités de la membrane induite par un conformateur en silicone versus celui en PMMA, d'évaluer la quantité de moelle osseuse totale nécessaire et d'évaluer les qualités ostéoinductrices de la simvastatine au sein d'une membrane induite. Cette étude vise à évaluer la faisabilité d'une reconstruction mandibulaire avec membrane induite sans et avec radiothérapie.

Les études *in vitro* ne permettent pas de répondre aux nombreuses questions soulevées par ce modèle. Les études chez le petit animal ont permis de tester différentes conditions, mais une reconstruction osseuse mandibulaire s'avère difficile. Le recours à un gros animal permet de se rapprocher le plus possible du modèle clinique humain. Le modèle animal choisi a été la brebis pour sa tolérance à la radiothérapie buccale et la présence d'une longue portion mandibulaire non dentée facilitant la réalisation d'une mandibulectomie segmentaire interruptrice. Il s'agit d'une étude qualitative et non pas quantitative.

Le nombre d'animaux par condition est donc restreint. Douze brebis constituent le groupe (6 brebis pour le groupe sans radiothérapie, 6 brebis pour le groupe avec radiothérapie) avec des sacrifices à 2 mois (6 brebis) et 6 mois (6 brebis) après la chirurgie de comblement.

78- Les poulets utilisent l'énergie de l'aliment pour leur entretien et leur croissance mais les réactions métaboliques s'accompagnent de production de chaleur, qui est source d'inefficacité énergétique. La composition de l'énergie de l'aliment (apportée par les protéines, lipides et glucides) est susceptible d'avoir un effet sur la production de chaleur des poulets. En particulier, les poulets sont capables de synthétiser des tissus adipeux à partir des lipides et de l'amidon de l'aliment mais la synthèse à partir d'amidon nécessite des étapes métaboliques supplémentaires génératrices de chaleur, par rapport aux dépôts des lipides alimentaires.

Les objectifs du projet sont de mesurer la production de chaleur et le bilan énergétique (différence entre l'ingestion et l'excrétion énergétique dans les déjections et sous forme de production de chaleur) de groupes de poulets recevant un aliment à faible ou à forte teneur en lipides. L'hypothèse de l'expérience est que la production de chaleur sera plus faible lorsqu'une proportion plus importante de l'énergie sera apportée sous forme de lipides. L'expérience impliquera 80 poulets de chair mâles âgés de 10 à 42 jours qui seront hébergés collectivement. Les animaux utilisés sont similaires à ceux utilisés en élevage pour la production de viande (espèce-cible de l'étude). Les poulets seront répartis en 2 lots et recevront successivement 2 aliments (faible ou forte teneur en lipides). Les mesures, d'une durée d'une semaine, seront conduites à partir de 14 jours d'âge sur des groupes de poulets (de 8 à 14 poulets en fonction de l'âge et du poids des animaux) issus en alternance de chaque lot. Chaque poulet pourra être utilisé au maximum 2 fois dans l'expérience. En dehors des mesures, tous les poulets seront élevés selon les pratiques courantes d'élevage et jusqu'au poids commercial d'abattage.

79- Problème de santé publique majeur, l'addiction correspond à un état psychopathologique au cours duquel l'obtention, la prise répétée et l'impossibilité de s'abstenir représentent une perte de contrôle sur la prise de drogues. Dans la dépendance à

certaines drogues ou à certains médicaments, de façon similaire à l'homme, l'arrêt de la prise entraîne chez le rongeur l'émergence d'un syndrome de sevrage. Ce syndrome peut alors être évalué chez le rongeur par différentes approches comportementales, neurochimiques et électrophysiologiques. En se basant plus particulièrement sur l'approche comportementale des syndromes de sevrage, l'objectif de ce projet est double :

- 1) Evaluer les risques de dépendance induite par certains nouveaux composés candidats médicament en cours de développement. Cette évaluation est exigée par les instances réglementaires.
- 2) Evaluer les effets sur les syndromes de sevrage de nouveaux composés qui pourraient être utiles comme outil thérapeutique pour le traitement de la dépendance aux drogues ou à certains médicaments et les comparer le cas échéant aux molécules déjà existantes.

Ce projet de 5 ans établi en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement prévoit l'utilisation d'un maximum de 720 rats et de 720 souris afin d'atteindre l'objectif 1 (procédure expérimentale 1), et l'utilisation d'un maximum de 7200 rats et de 7200 souris afin d'atteindre l'objectif 2 (procédures expérimentales 2, 3 et 4).

80- Le présent projet a pour cadre le développement d'un nouveau médicament.

Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales de toxicologie et de toxicocinétique, par administration répétée, réalisées chez le rat, pour des durées de 2, 4 ou 13 semaines. Les résultats issus de ce projet sont réglementairement requis pour initier les essais cliniques, estimer la première dose à administrer chez l'Homme, et constituer les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments auprès des autorités de santé.

Une procédure expérimentale de recherche de doses, plus courte et réalisée sur un petit nombre d'animaux, pour déterminer les doses pertinentes à utiliser dans les études réglementaires est également présentée dans ce projet. En réduisant ainsi le risque d'études ultérieures non conclusives, cette procédure contribue à optimiser le nombre total d'animaux utilisés dans le projet.

Ce projet est conçu pour être répété, en totalité ou partiellement, pour caractériser les effets toxiques de chaque nouveau candidat médicament testé. La sélection des procédures à réaliser est faite sur la base des données disponibles et de la stratégie de développement du médicament, de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés.

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

L'effectif total estimé est de 7920 animaux utilisés dans ce projet sur 5 ans.

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

Enfin, un petit nombre d'animaux supplémentaires étant prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion, ils pourront, à la fin de la procédure expérimentale, être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet.

Dans tous les cas, les animaux surnuméraires non inclus dans une procédure expérimentale sont euthanasiés et éventuellement utilisés pour produire des matrices biologiques, indispensables aux activités de bioanalyse.

81- Les antiparasitaires sont des traitements indispensables pour les animaux de compagnie afin de leur éviter des infestations par des parasites aussi bien externes (puces, tique, ...) qu'internes (vers, acariens, ...). En effet, ces parasites peuvent causer aux animaux infestés des désagréments mineurs comme parfois des maladies graves et également des zoonoses (maladies transmises à l'homme). L'enjeu de ces produits est donc la santé animale comme la santé humaine.

Les produits antiparasitaires externes sont appliqués par voie topique, c'est-à-dire directement sur le poil de l'animal.

Le but du projet est de déterminer comment et avec quelle rapidité les actifs contenus dans un produit fini se distribuent sur les poils de chiens afin de suivre les concentrations efficaces. Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion de ces produits sur les poils et dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ces produits. De plus, comme le chien est l'espèce cible des produits testés dans ce projet et que sa peau, ses poils et son sébum sont différents de ceux d'autres espèces, il est important de travailler directement sur cette espèce, dans les conditions réelles d'utilisation, pour avoir des résultats exploitables, le remplacement par des méthodes alternatives ou des études sur d'autres espèces a donc été évalué mais n'est pas possible pour ce projet. 10 tests de formulation sont prévus dans ce projet. Le nombre de chiens par étude a été réduit au minimum: 6 chiens beagle provenant d'élevage agréés seront utilisés par test, soit 60 chiens au total). On ne peut pas réduire plus ce nombre à cause de la variabilité de la distribution sur les poils. Des échantillons de poils de chiens traités avec le produit, ainsi que des échantillons de sang seront prélevés et analysés.

Le mode d'administration des produits (topique) et de prélèvements de poils sont non invasifs. Les prélèvements sanguins sont la seule procédure invasive de ce projet et sont réduits au minimum. L'hébergement individuel étant requis pour ce type d'étude afin d'éviter les contaminations entre individus, une attention particulière est donc portée au raffinement et à l'enrichissement

du milieu pour éviter l'ennui: contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, sorties régulières, jouets, ...

82- Le présent projet a pour cadre le développement d'un nouveau médicament. Il s'agit d'un projet générique, constitué d'un ensemble de procédures expérimentales de pharmacocinétique en dose unique et en doses répétées, de distribution tissulaire et de métabolisme menées chez le rat.

Il est conçu pour être répété en totalité ou partiellement pour chaque produit testé. Il permet d'obtenir les informations relatives à l'absorption, à la distribution, au métabolisme et à l'élimination du principe actif étudié, nécessaires pour confirmer, le cas échéant, la pertinence de l'espèce rat pour les études de toxicologie, pour contribuer à la sélection des doses, fréquence et voie d'administration pour les études de toxicologie lorsque l'espèce retenue est le rat, pour contribuer à la sélection de la première dose à administrer lors des essais cliniques chez l'Homme et constituer les dossiers d'enregistrement de nouveaux médicaments auprès des autorités de santé. Les résultats obtenus pourront aussi être utilisés en support aux études de pharmacologie. Lorsque cela est possible, plusieurs procédures expérimentales peuvent être combinées de façon à réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour chaque procédure expérimentale, les objectifs, les moyens expérimentaux mis en œuvre (s'appuyant sur nos modes opératoires standard), les conditions d'hébergement et d'utilisation des animaux et le nombre de lots sont définis pour répondre aux exigences réglementaires et/ou aux pratiques reconnues par la communauté scientifique. Un plan d'étude est rédigé pour chaque utilisation d'une procédure expérimentale dans le cadre de l'évaluation d'un candidat médicament. Il précise les éléments spécifiques comme le calendrier, les conditions de traitement (voie, dose, fréquence) et d'examen, les gestes techniques. Les effectifs prévus sont les effectifs usuellement utilisés pour ce type d'étude et permettent de garantir l'exécution du plan d'étude et d'assurer un nombre d'animaux suffisant pour conclure de façon scientifiquement pertinente. L'effectif total estimé est de 2020 animaux utilisés dans ce projet sur 5 ans.

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

Enfin, un petit nombre d'animaux supplémentaires étant prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion, ils pourront, à la fin de la procédure expérimentale, être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet.

Dans tous les cas, les animaux supplémentaires non inclus dans une procédure expérimentale sont euthanasiés et éventuellement utilisés pour produire des matrices biologiques, indispensables aux activités de bioanalyse.

83- La transmission et l'établissement du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) 1 aux êtres humains restent des enjeux i) scientifiques et ii) de santé publique majeur. Malgré une prise en charge efficace des patients par la trithérapie, de nouvelles lignes de traitement doivent être développées, notamment pour les patients, hôtes du VIH, en situation d'échec thérapeutique.

Nous avons établi des modèles de souris Humanisées pour le Système Immunitaire (souris HSI) : ces modèles reposent sur la xéno-transplantation de cellules souches hématopoïétiques humaines chez des souris particulièrement permissives à l'établissement durable des cellules humaines transplantées et greffées – maintien d'une population de cellules souches totipotentes et de populations de cellules progénitrices de différents lignages du système immunitaire - leucocytes non T non B, lymphocytes et cellules du stroma des organes lymphoïdes-.

Au niveau fondamental, la création et l'utilisation de souris HSI permettent « d'approcher » la physiologie humaine de manière expérimentale et prospective.

Au niveau industriel, ce modèle représente une plate-forme préclinique attrayante pour le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, comparativement aux primates non humains pour lesquels il existe nombre de limitations posées par des considérations éthiques et financières.

Il a déjà été largement démontré que chez les souris HSI le VIH s'établit durablement et que sont analysables le profil des charges virales et les effets de nouvelles approches visant à en réduire l'effectif voire à en assurer la clairance de toutes les populations - se répliquant et quiescentes-. Les souris HSI répondent donc aux exigences de remplacement, réduction et raffinement en permettant de ne plus dépendre de primates non-humains, et du fait des évolutions technologiques opérées sur le modèle de souris HSI réduisant fortement la variabilité inter-individus. Les souris HSI donnent donc un accès de plus en plus pertinent à l'analyse du processus infectieux qu'initie et établit in vivo l'injection du VIH, ce, en permettant donc de tester l'efficacité et l'innocuité de nouveaux traitements qui visent à réduire les effectifs voire à éliminer toutes les populations de VIH.

L'objectif majeur de ce projet consiste en la mise en place et la validation d'un modèle de souris HSI, souris chez lesquelles post l'inoculation d'une population de VIH, cette dernière se déployant dans les cellules humaines. Le recours à de telles souris permet le criblage préclinique de nouvelles drogues antirétrovirales. Du fait des contraintes logistiques et techniques intrinsèques à la génération des souris HSI, nous ne prévoyons pas d'utiliser plus de 150 animaux par an pour ce projet (soit un total de 750 animaux sur 5 ans).

84- Les antiparasitaires sont des traitements indispensables pour les animaux de compagnie afin de leur éviter des infestations par des parasites aussi bien externes (puces, tique, ...) qu'internes (vers, acariens, ...). En effet, ces parasites peuvent causer aux animaux infestés des désagréments mineurs comme parfois des maladies graves et également des zoonoses (maladies transmises à l'homme). L'enjeu de ces produits est donc la santé animale comme la santé humaine.

Les produits antiparasitaires externes sont appliqués par voie topique, c'est-à-dire directement sur le poil de l'animal.

Le but du projet est de déterminer comment et avec quelle rapidité les actifs contenus dans un produit fini se distribuent sur les poils de chats afin de suivre les concentrations efficaces. Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion de ces produits sur les poils et dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ces produits. De plus, comme le chat est l'espèce cible des produits testés dans ce projet et que sa peau, ses poils et son sébum sont différents de ceux d'autres espèces, il est important de travailler directement sur cette espèce, dans les conditions réelles d'utilisation, pour avoir des résultats exploitables, le remplacement par des méthodes alternatives ou des études sur d'autres espèces a donc été évalué mais n'est pas possible pour ce projet. 10 tests de formulation sont prévus dans ce projet. Le nombre de chats par étude a été réduit au minimum: 6 chats beagle provenant d'élevage agréés seront utilisés par test, soit 60 chats au total). On ne peut pas réduire plus ce nombre à cause de la variabilité de la distribution sur les poils. Des échantillons de poils de chats traités avec le produit, ainsi que des échantillons de sang seront prélevés et analysés.

Le mode d'administration des produits (topique) et de prélèvements de poils sont non invasifs. Les prélèvements sanguins sont la seule procédure invasive de ce projet et sont réduits au minimum. L'hébergement individuel étant requis pour ce type d'étude afin d'éviter les contaminations entre individus, une attention particulière est donc portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui: contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, jouets, ...

85- Les dispositifs intravaginaux représentent un outil d'aide à la reproduction bovine et de ce fait contribuent à l'amélioration des résultats en élevage bovins. Ces dispositifs sont destinés à être placés dans le vagin des femelles pendant plusieurs jours consécutifs (environ 7 jours en moyenne), et libèrent des substances hormonales, progestérone ou analogues. Lors du retrait du dispositif, la chute de cette libération hormonale entraîne l'apparition de chaleur chez la femelle et favorise la mise à la reproduction. La mise au point de ces dispositifs nécessite d'optimiser la tolérance locale au niveau du vagin (contact avec la muqueuse plusieurs jours de suite) ainsi que la capacité de relargage hormonal du dispositif dans l'organisme. Cette optimisation passe par l'étude de différents matériaux et de différentes concentrations hormonales initiales. Aucun sacrifice animal n'est nécessaire à ces observations. La réutilisation des femelles incluses dans les procédures expérimentales de ce projet peut être envisagée en fonction de la durée et de l'espacement des procédures considérées. Les hormones relarguées s'apparentent aux hormones naturellement produites par les femelles: elles n'entraînent pas de toxicité pour l'organisme et sont rapidement éliminées par celui-ci.

Les réactions d'intolérance locale qui pourraient être observées au niveau de la muqueuse vaginale peuvent être suivies par vaginoscopie et leur réversibilité documentée.

Les études de tolérance et de pharmacocinétique pour le développement réglementaire de médicaments vétérinaires vont permettre d'étudier et de caractériser le comportement du médicament dans l'organisme de l'espèce de destination auquel il est dédié: tolérance locale et générale, détermination de dose, biodisponibilité, bioéquivalence. Les procédures expérimentales correspondantes sont réalisées dans l'espèce de destination selon les lignes directrices en vigueur. Ces lignes directrices définissent le nombre minimal d'animaux requis ainsi que le schéma expérimental le plus adapté à la finalité de l'étude.

Le nombre total de femelles bovines nécessaire à la réalisation de ce projet est variable en fonction du nombre de répétition de la procédure expérimentale de mise au point et de la capacité de réutilisation des femelles sans toutefois excéder une centaine de femelles sur 5 ans. Les femelles utilisées sont des femelles bovines non gestantes, qui peuvent avoir été ovariectomisées. Elles sont hébergées dans leur cadre de vie habituel, alternant des passages en stabulation avec des passages en pâture à l'extérieur.

86- Le nombre de patients diabétiques de type-2 est en augmentation constante, il devrait au cours des prochaines décennies avoisiner, au niveau mondial, les 300 millions. Les traitements actuels, même s'ils sont efficaces restent limités sur l'évolution à long terme de la pathologie.

Le diabète de type-2 ainsi que ses complications nécessitent ainsi des solutions thérapeutiques plus efficaces et sans effets adverses. La recherche de nouvelles solutions pharmacologiques qui favorisent chez les patients le contrôle de la glycémie et/ou l'amélioration de l'efficacité de l'insuline sur les tissus périphériques reste indispensable. Le concept sur lequel nous travaillons vise à cibler à la fois le métabolisme énergétique mais également la chronobiologie des patients et ainsi favoriser une meilleure évolution de la pathologie et de ses complications associées.

Dans ce projet, l'évaluation pharmacologique de nouvelles entités chimiques, représentant de nouvelles alternatives aux thérapies actuelles, se fera à l'aide de différents modèles animaux. Les caractéristiques distinctes des modèles utilisés permettront de répondre aux problématiques rencontrées dans l'évaluation et la caractérisation d'un futur candidat médicament.

Les inconforts produits chez les animaux utilisés seront majoritairement d'ordre métabolique, (perturbations du métabolisme glucidique et lipidique induits par voie alimentaire ou chimique). Les modèles animaux sélectionnés serviront à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouvelles molécules dans un contexte pathologique et devront mettre en évidence un effet bénéfique des composés sur un ensemble de paramètres biologiques et biochimiques.

Les bénéfices envisagés pour la santé humaine sont la découverte de nouveaux traitements du diabète de type-2 et/ou de ses complications ainsi que la mise en évidence de nouveaux mécanismes biologiques permettant de prévenir et/ou de traiter cette pathologie complexe et multifactorielle, pour laquelle les besoins médicaux ne sont pas encore totalement satisfaits.

L'évaluation du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux est nécessaire. En effet, même si les composés ont démontré une activité dans des modèles cellulaires « in vitro », l'administration des composés à un animal (rongeur) permet d'évaluer l'efficacité thérapeutique des composés dans un système biologique complexe et « global ».

Le diabète de type-2 et ses complications sont des pathologies qui nécessitent un traitement chronique et de ce fait nécessairement réalisé avec des modèles animaux. Le nombre d'animaux engagés en 5 années est estimé à 3600 unités, il est adapté aux besoins de profilage de différents composés et à la caractérisation des doses thérapeutiques optimales.

Pour limiter ce nombre, les procédures sont organisées afin de maximiser la nature des informations issues de l'expérimentation animale. Toutes les procédures utilisées dans ces évaluations sont de classe légère et ne génèrent que des troubles mineurs pour les animaux que nous nous efforcerons de minimiser par l'optimisation des conditions d'hébergement et par la définition des points limites adaptés aux modèles et procédures utilisés.

87- La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie chronique fréquente dans le monde occidental. Elle est une conséquence possible du syndrome métabolique (insulinorésistance, diabète de type II, obésité), d'infections virales (hépatite C chronique) ou de l'exposition à certains médicaments (chimiothérapie). La NASH se caractérise par une stéatose du tissu hépatique (accumulation de lipides dans le foie) accompagnée d'une nécro-inflammation, avec ou sans fibrose. Cette affection est associée à une évolution pathologique grave puisqu'au stade tardif de la maladie, une cirrhose hépatique et ses complications potentielles, insuffisance hépatique et hépatocarcinome (HCC) peuvent survenir.

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

L'évaluation des propriétés thérapeutiques de ces composés pharmaceutiques dans des indications plus avancées telles que la cirrhose et le HCC est également envisagée.

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

Dans un souci permanent du bien-être animal et afin de minimiser l'emploi des animaux de laboratoire, l'évaluation des molécules sera réalisée en priorité dans des modèles *in vitro*. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal. Ce projet requerra au maximum 5756 petits rongeurs (2664 souris et 3092 rats), ils pourront être utilisés sur cinq années afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des composés. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

88- Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer une potentielle action antitussive d'une nouvelle molécule candidat-médicament chez le cobaye exposé à un agent déclencheur de la toux (agent tussif).

Au cours de chaque étude, avant d'être exposés à l'agent tussif, les animaux (5 groupes avec 8 animaux par groupe; soit un nombre prévisionnel maximum de 9600 animaux sur 5 ans) sont traités préventivement avec ce candidat-médicament testé à 3 doses différentes, avec un produit antitussif de référence ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Pendant et après l'exposition à l'agent tussif, le nombre d'épisodes de toux est comptabilisé et la fonction respiratoire des animaux est évaluée.

Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé sur le cobaye car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la toux. A ce jour, le cobaye 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).

89- L'objectif à terme du projet MACULIA est de développer une formule nutraceutique, c'est-à-dire un composé actif issu de substance alimentaire et/ou un candidat médicament, pour traiter la forme sèche de la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age). La DMLA est une maladie oculaire qui survient avec le vieillissement et se traduit par une perte progressive de la vision centrale. En France, c'est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. Avec l'augmentation de la durée de vie, cette pathologie est appelée à toucher un nombre croissant d'individus. Nous proposons dans ce projet d'identifier des molécules protectrices originales pour traiter la forme atrophique de la DMLA en combinant une approche *in vitro* utilisant un modèle de phototoxicité original développé par l'institut de la Vision, et une approche *in vivo*, dans un modèle de DMLA chez le rat. Ce modèle sera utilisé pour identifier des substances naturelles protectrices, le modèle cellulaire permettant de sélectionner les composés les plus actifs qui seront ensuite validés chez l'animal. Les études de pharmacocinétique oculaire chez le rat et la souris permettront de doser la présence des molécules actives dans l'œil et de déterminer la posologie optimale pour les essais pharmacologiques dans les modèles animaux de DMLA. Dans ce projet seront utilisés 66 à 132 rats maximum et 66 souris pour les études de pharmacocinétique et 120 rats pour les études d'efficacité. Ce projet a été élaboré en suivant la règle des 3R, cependant la physiologie particulière de l'organe cible (l'œil) et les voies d'administrations du test item (per os) justifient le recours à l'animal. Les résultats des tests cellulaires réalisés et une analyse statistique de données bibliographiques permettront de sélectionner les principes actifs présentant la meilleure efficacité et d'anticiper le nombre minimal d'animaux nécessaire pour observer significativement cette efficacité. Un enrichissement des cages d'hébergement par des abris et papier ainsi qu'un suivi quotidien des rongeurs seront effectués.

90- L'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'Histoire. C'est une véritable épidémie qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. L'Organisation Mondiale de la Santé place actuellement sa

prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle. Les données épidémiologiques suivantes décrivent l'ampleur du phénomène:

- Sur 6 milliards d'individus, 3 milliards sont sous-alimentés et les autres sont en train de devenir obèses.

- 50 % des américains sont en surpoids et 25 % franchement obèses.

- L'Europe compte 30 % d'adultes en surpoids et le nombre d'enfants obèses a doublé en cinq ans.

- L'obésité touchait en France en 2012, 15% de la population adulte, correspondant à un peu plus de 6,9 millions d'obèses, soit environ 3,3 millions de plus qu'en 1997. Un tiers de ces patients sont hypertendus, un tiers diabétiques et un tiers hyperlipidémiques.

- Une progression inquiétante car elle porte sur des individus de plus en plus jeunes.

Plusieurs facteurs permettent d'expliquer l'obésité: les facteurs génétiques qui ont un rôle indéniable mais ne sont pas les seuls responsables, les facteurs endocrinologiques (dérèglements hormonaux, glandulaires) mais surtout les facteurs environnementaux et les modifications comportementales. Une alimentation trop riche (nourriture à haute teneur en graisses) et un manque d'activité physique entraînent un réel déséquilibre entre l'alimentation ingurgitée et celle dépensée.

Des traitements médicamenteux existent ayant une action sur le système nerveux central ou une action sur le système périphérique mais de nombreux effets secondaires sont constatés sur le rythme cardiaque, la pression sanguine, le système digestif et l'humeur pouvant entraîner des dépressions parfois sévères.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un produit naturel par rapport à un autre produit naturel aux effets reconnus sur l'obésité liée à des facteurs environnementaux ainsi que par rapport à deux références médicamenteuses. Dans ce but, après une période de quarantaine et d'acclimatation de 12 jours au cours de laquelle les 36 rats femelles de l'étude seront nourris avec un régime standard, ces animaux seront nourris avec un régime enrichi en graisses animales (lard) spécifique et les traitements auront lieu quotidiennement par voie orale dès le début de l'induction de l'obésité pendant 6 semaines. Ce protocole expérimental sur le modèle d'obésité a déjà fait l'objet de publication par notre laboratoire.

91- Les infections cornéennes représentent une cause très importante de cécité dans le monde. Elles peuvent être dues à des bactéries, des virus (dont le plus fréquent est l'Herpès), des parasites (dont le plus fréquent est l'amibe tellurique), et des champignons. Leur sévérité étant le plus souvent liée au retard de la prise en charge et à la virulence de l'agent infectieux en cause il est important de l'identifier le plus rapidement possible. L'examen simple de l'ophtalmologiste ne permet le plus souvent pas d'identifier quel agent est en cause.

Actuellement le diagnostic de la cause de l'infection repose donc sur des examens de laboratoire de microbiologie à partir de prélèvements réalisés par grattage ou écouvillonnage de la surface de la cornée infectée. Tous ces examens ne sont évidemment pas disponibles sur toute la planète et, par ailleurs ils sont assez souvent mis en défaut car la quantité de matière prélevable sur la cornée est très limitée et certains agents (parasites et champignons) très difficiles à révéler.

La microscopie confocale in vivo (MCIV) est une méthode d'examen NON INVASIVE, réalisée sur le patient après simple anesthésie de la cornée par le collyre habituel que l'ophtalmologiste utilise lors de tout examen. Elle permet d'obtenir une véritable biopsie optique permettant une analyse microscopique SANS PRELEVEMENT.

Nous pensons cependant que la MCIV pourrait obtenir de meilleurs résultats en utilisant des marqueurs SPECIFIQUES des microorganismes responsables des infections cornéennes et ainsi identifier EN DIRECT « AU LIT DU MALADE » l'agent infectieux en cause pour proposer au plus vite le traitement adapté.

Le but du travail soumis au CEEAL-UJM est d'étudier d'un nouveau marqueur fluorescent spécifique à l'infection bactérienne. Nous avons pour cela besoin de les tester sur des modèles animaux d'infection cornéenne. Le modèle lapin est de loin le plus adapté car l'anatomie de sa cornée est proche de celle de l'homme, ce qui la rend examinable par le microscope confocal in vivo et permet un suivi facile de son état pour les animaliers et les expérimentateurs. Le modèle d'infection est une kératite bactérienne, c'est à dire une infection des cellules superficielles de la cornée SANS diffusion au reste de l'organisme. La quantité de bactéries est faible et la kératite bactérienne n'est pas dangereuse pour l'homme.

Au total, 6 lapins sont potentiellement prévus pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs et prend en compte le risque que certains animaux puissent être exclus au cours du projet. Ce projet doit obligatoirement être mis en œuvre in vivo afin d'être au plus proche de la situation clinique chez l'homme, et il est éthiquement inconcevable de mettre en place un tel projet directement chez l'homme. Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (lapin sous anesthésie générale pendant l'inoculation de l'agent infectieux, traitement antalgique après infection, suivi quotidien dans les 3 jours suivants l'injection), des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toutes souffrances inutiles à l'animal afin de le sortir le plus rapidement possible de l'expérimentation et donc de le soulager. De même, toutes les mises à mort des animaux seront effectuées de façon à limiter au maximum le stress et la douleur.

92- Au cours des dernières années nous avons fait des progrès remarquables vers la compréhension des mécanismes de base régulant le sommeil, et en particulier concernant le rôle de la lumière sur le sommeil et la vigilance. Ces découvertes nous permettent de suggérer un nouveau modèle de régulation du sommeil. Un troisième processus de régulation par la lumière complète le modèle classique "à deux processus" : circadien (C; correspondant au cycle veille/sommeil de 24 heures déterminé par l'horloge interne située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus -NSC) et homéostatique (S; équilibre dynamique de la pression de sommeil augmentant au fur et à mesure de l'éveil et diminuant au cours du sommeil). Le troisième mécanisme correspond à l'influence directe non-circadienne de la lumière. En outre, nous proposons que la lumière (via des cellules ganglionnaires exprimant un photorécepteur: la mélanopsine) puisse moduler directement le processus homéostatique.

Dans le cadre de l'étude de cette régulation, plusieurs modèles rongeurs ont été élaborés dans le but de bloquer les systèmes de régulation du rythme circadien, et de garantir ainsi la simple observation des effets directs de la lumière. Cette pré-étude porte sur un modèle murin en particulier dont l'horloge centrale est inactivé par le Knock out (KO) conditionnel du gène horloge *Bmal1* dans le NSC. La bibliographie révèle qu'une altération de ce gène, aboutit à une arythmicité du cycle circadien, perturbe la sécrétion d'insuline et cause l'élévation de la glycémie (cette perturbation pouvant évoluer en diabète sucré). Le diabète sucré aura pour conséquence une accumulation d'hydrates de carbones non métabolisés dans le sang. Cette accumulation causera des lésions dans de nombreux organes et notamment au niveau de la rétine où passe l'information lumineuse. Le suivi de la glycémie sur un nombre restreint d'animaux nous indiquera si ce modèle présente un risque de lésion diabétique, ce qui entraînerait des résultats faussés dans l'étude du sommeil.

La pré-étude portera sur 15 animaux (5 animaux par génotypes sauvage (WT), contrôle du gène conditionnel (*Syt10*) et knock out conditionnel pour *Bmal1* (double KO *Syt10* et *Bmal1*)).

L'évaluation de la glycémie sur 5 souris sélectionnées de manière à être représentatives de la répartition pondérale des animaux, nous permettra de voir si il y a un risque de diabète de type 2 chez notre population. Les animaux seront maintenus en groupe social et la manipulation sera réalisée le plus rapidement possible pour limiter le stress. L'utilisation d'animaux entier est nécessaire au vu du nombre de mécanismes et de la multitude d'organes entrant dans la régulation de la glycémie (cerveaux, foie).

93- L'exposition à la nicotine pendant la grossesse affecte le développement des systèmes sérotoninergique et dopaminergique du cerveau. Des extraits de tabac et des extraits de fumée contenant tous les composants du tabac et de la fumée pourraient être plus intéressants que la nicotine seule pour étudier les effets comportementaux induits par le tabagisme. On n'en connaît pas les conséquences sur l'activité électrophysiologique des neurones dopaminergiques et sérotoninergiques.

Pour étudier ces conséquences nous utiliserons des rates gestantes auxquelles nous administrerons durant la gestation soit du sérum physiologique, soit de la nicotine, soit des extraits de tabac ou de fumée de cigarette. Nous étudierons ensuite chez les rats nés de ces mères l'activité des neurones par électrophysiologie, sous anesthésie, à l'adolescence (7 semaines) et à l'âge adulte (14 semaines).

Nous comptons reproduire une situation analogue à celle des enfants dont la mère a consommé du tabac durant sa grossesse. L'effet d'une exposition prénatale au tabac chez le petit ne peut être d'après nous étudié qu'en soumettant la femelle à ce produit durant la gestation et en étudiant le fonctionnement du cerveau d'un animal s'étant développé dans ces conditions, à l'âge adulte. Nous avons choisi d'utiliser les rats car ils sont suffisamment proches de l'homme et leur système nerveux central est bien connu. La gestation des rates n'étant que de 21 jours, la durée du traitement prénatal est donc aussi relativement courte.

Nous réduisons à sa valeur nécessaire le nombre d'animaux utilisés en effectuant un calcul prévisionnel statistique de puissance. Le nombre maximum de rates gestantes que nous prévoyons d'utiliser est de 44. Le nombre de rats enregistrés sera de 320. Nous serons très attentifs aux conditions d'hébergement des animaux et à leur état de santé.

94- La maladie de Parkinson est une affection neurodégénérative pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif efficace. Les causes de la maladie sont encore mal connues mais de nombreuses études ont montré que des processus d'inflammation cérébrale pourraient participer à la mort neuronale. La réaction neuroinflammatoire pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante pour la maladie de Parkinson.

L'objectif de cette étude pilote sera d'étudier la réaction neuroinflammatoire dans un modèle primate de maladie de Parkinson et de déterminer si celle-ci pourrait constituer un marqueur fiable d'évolution de la maladie. Nous avons choisi un primate de petite taille, le singe écureuil, dont l'état parkinsonien et neuroinflammatoire pourront être évalués de façon longitudinale grâce à des techniques d'imagerie cérébrale (IRM).

Les procédures utilisées seront: 1) l'induction d'un état parkinsonien par injection intramusculaire d'une neurotoxine (MPTP), 2) des examens IRM, 3) des prélèvements de sang et de liquide céphalo-rachidien. Des analyses post mortem complèteront cette étude afin de caractériser les processus neuroinflammatoires à l'échelle moléculaire et cellulaire.

Au total, 20 animaux divisés en 4 lots seront utilisés pour ce projet et seront repartis comme suit: 5 animaux pilotes, 5 animaux contrôles, 5 animaux euthanasiés 3 mois et 12 mois après l'intoxication au MPTP.

Les mesures prises pour optimiser le bien-être des animaux et réduire leur souffrance seront:

1) hébergement en volière pour favoriser les interactions sociales, 2) aménagement avec différents modules d'enrichissement (échelles, tubes et pneus suspendus, plateforme, jouets, miroirs), 3) régime alimentaire adapté et varié (croquettes, friandises, fruits, graines), 4) surveillance vidéo permanente, 5) cages adaptées pour les individus parkinsoniens afin de réduire les risques de chute (hébergement par deux), 6) médicaments anti-parkinsoniens en cas d'anomalies motrices sévères.

La présente demande concerne un projet à long terme et nous estimons 1) qu'il est indispensable de mettre au point et d'optimiser au préalable toutes les procédures expérimentales sur 5 animaux pilotes déjà utilisés, par ailleurs, dans une étude antérieure, 2) que la taille des groupes expérimentaux fixée à 5 est le minimum requis pour l'analyse statistique et assurer l'interprétation des résultats. En conclusion, ce nouveau modèle préclinique de la maladie de Parkinson permettra de tester des traitements neuroprotecteurs tout en élargissant nos connaissances sur le processus pathologique de cette maladie.

95- Ce projet a pour but de déterminer la biodistribution de la maurocalcine (M_{Ca}, peptide de pénétration cellulaire) dans le cas de rats porteurs de glioblastomes. Il s'intègre dans une étude qui vise à évaluer la pertinence de l'utilisation de la maurocalcine

couplée à diverses molécules antitumorales comme nouvel agent anticancéreux dans le cas de tumeurs gliales. Deux composés seront étudiés: la maurocalcine couplée à de l'iode radioactive (1125), et la maurocalcine couplée à un fluorochrome (Cy5).

Cette évaluation *in vivo* fait suite à une évaluation *in vitro* des composés et est nécessaire à la caractérisation de ces molécules ainsi qu'à la détermination de leur intérêt potentiel en thérapeutique (la lignée de rat Fisher est indispensable pour l'utilisation de la lignée cellulaire F98 sur laquelle les tests *in vitro* ont été effectués).

Les rats seront des mâles (pas ou peu d'influence hormonale contrairement aux femelles) âgés de 7 semaines, classiquement utilisés pour ce type d'étude. Pour ce type d'évaluation il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Afin de déterminer le comportement des deux composés *in vivo*, des cellules F98 (cellules tumorales gliales de rat semblables aux cellules tumorales gliales humaines) seront injectées de façon stéréotaxique au niveau du striatum de rats Fisher. 50 rats au total seront utilisés pour cette étude: 15 rats pour la partie « MCa-iode radioactive » (+ 10 rats contrôle non porteurs de tumeur, soit 25 au total), et 15 pour la partie « MCa-fluorochrome » (+ 10 rats contrôle non porteurs de tumeur, soit 25 au total) seront nécessaires pour un résultat statistiquement significatif, soit 50 rats au total. Ce nombre d'animaux a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué régulièrement. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

96- L'objectif de notre projet est de comprendre le rôle du gène étudié chez l'adulte. En effet, des études précédentes que nous avons réalisées ont montré que les souris ne possédant pas ce gène (après inactivation au moment de l'étude) avaient une survie de moins de 15 jours. Les analyses effectuées avant la mort des animaux ont mis en évidence des anomalies immunologiques notamment compatibles avec une septicémie ou encore une immunodéficience (nombre de globules blancs, marqueurs de l'inflammation anormaux). Ceci laissant penser à un rôle dans l'immunité que nous souhaitons mettre en évidence. Ainsi, ces souris seraient un modèle permettant d'étudier l'immunodéficience et le syndrome de défaillance multi organique, maladie à ce jour très mal connue chez l'Homme, puis éventuellement de traiter les patients humains atteints par ces syndromes.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux chez lesquels les techniques de mutation génétique pertinentes pour cette étude sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vivo* ne peut remplacer le fonctionnement du système immunitaire et ses interactions avec l'organisme.

La mutation génétique étudiée a des conséquences sur l'animal. Afin de réduire toute souffrance à son minimum, les animaux seront euthanasiés dès les premiers signes de perte de poids. Le stress induit par les traitements sera également réduit en administrant au maximum les substances dans l'eau de boisson. Le stress ou la faible douleur induite par les prises de sang seront également réduits par l'utilisation d'anesthésiques locaux ou généraux selon les volumes prélevés et sites de prélèvement.

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

En effet, les précédentes études ont permis d'avoir des résultats avec des groupes de 6 à 8 animaux. Ainsi, dans ce projet un total de moins de 30 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales. De même, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

97- Notre institut a pour mission de créer des lignées de souris génétiquement modifiées.

Une modification au niveau de l'ADN génomique permet de créer une nouvelle lignée de souris. Ces lignées de souris peuvent devenir des modèles de maladie humaine et vont permettre de mieux comprendre le processus de développement des maladies humaines. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces souris, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques. Toutes les lignées générées le seront au stade hétérozygote et donc aucun phénotype lié à la modification génétique n'est attendu.

Les embryons de souris manipulés, pour être génétiquement modifiés, sont produits par super-ovulation de souris femelles. Cette super-ovulation est pratiquée par injection d'hormones (pour augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement). Cette technique permet de réduire le nombre de femelles nécessaire pour la création d'une lignée transgénique.

Ces embryons sont ensuite micro-manipulés pour produire des animaux génétiquement modifiés.

Il y a 2 techniques utilisées: soit par micro-injection d'ADN (appelé transgène) dans le noyau d'un embryon âgé d'un jour (injection pronucléaire d'ADN) soit par l'injection de cellules souches embryonnaires génétiquement modifiées dans la cavité d'un embryon âgé de 3,5 jours appelé blastocyste.

Ces embryons manipulés sont ensuite réimplantés dans une souris mère-porteuse, en pratiquant une petite intervention chirurgicale. Les souriceaux, nés des mères-porteuses, sont ensuite analysés pour identifier les individus transgéniques.

Chaque lignée de souris transgénique est ensuite archivée, soit sous forme d'embryons congelés, soit sous forme de sperme congelé. Le maintien des embryons sous forme congelée ainsi que la congélation du sperme permettent de sauvegarder les lignées transgéniques dans le temps sans les garder sous forme respirante (animaux vivants) et favorise les échanges. La congélation sous forme d'embryons ou de spermatozoïdes des différentes lignées de souris permet de simplifier les transferts entre laboratoire géographiquement éloignés et/ou de statut sanitaire incompatible. La congélation (et donc l'archivage) fait appel à des femelles superovulées.

Toutes ces techniques nécessitent l'utilisation d'animaux. La réduction du nombre de souris utilisées, leur bien-être sont une préoccupation permanente. L'amélioration des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement.

Pour les 250 lignées produites chaque année qui sont l'objet de cette autorisation, nous estimons nos besoins en animaux à 380 000 souris maximum pour les 5 ans du projet.

Il est néanmoins important de noter que nous comptons diminuer ce nombre en passant progressivement sur la congélation de spermatozoïdes (en lieu et place d'embryons), ce qui nous permettrait de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour l'archivage. Nous estimons ce nombre à une centaine d'animaux par lignée (soit environ 25000 animaux par an)

98- L'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine. Elle touche 1 % de la population française et constitue un problème de santé publique majeur.

Parmi les épilepsies, 60% sont focales, c'est à dire que l'activité paroxystique anormale typique de l'épilepsie n'est présente que dans une région du cerveau. Ces épilepsies focales s'accompagnent de troubles moteurs, cognitifs ou émotifs, récurrents et très invalidants pour les patients. En dépit de nombreuses avancées thérapeutiques, 60% de ces épilepsies sont pharmacorésistantes et parmi elles seules 30 % sont opérables.

Le seul traitement chirurgical disponible à l'heure actuelle consiste à réséquer le foyer épileptogène, et n'est envisageable que s'il se situe dans une zone non éloquentielle du cortex. La stimulation électrique des structures profondes du cerveau a donné des résultats encourageants mais beaucoup de paramètres sont à affiner. Cette technique offre l'avantage d'être réversible, peu invasive et d'être bien maîtrisée. Même si elle est communément utilisée dans la maladie de Parkinson, son effet thérapeutique dans l'épilepsie reste à confirmer. Le noyau antérieur du thalamus (NA) pourrait être une cible pertinente pour les épilepsies temporales. En effet, des études chez le rat et récemment chez le patient vont dans ce sens, mais les effets sont très hétérogènes et beaucoup de questions restent sans réponse. Ainsi notre étude vise à identifier les paramètres de stimulation du NA qui seront les plus efficaces sur les crises temporales et à en quantifier les effets thérapeutiques. Cette étude s'effectuera sur le modèle pénicilline du singe, qui est un animal phylogénétiquement proche de l'humain et qui présente un cerveau suffisamment comparable pour générer des connaissances pertinentes vis-à-vis de la pathologie humaine. L'épilepsie étant une pathologie neurologique complexe, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de la simulation informatique. Cette étude sera divisée en deux phases (une phase exploratoire d'enregistrement de neurones du NA hors et pendant les crises d'épilepsie et une phase portant sur les effets thérapeutiques de la stimulation déduits de la phase 1), et requerra l'utilisation de 4 singes. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. L'état de santé des animaux sera surveillé et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur tout le long du projet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (suppression de la douleur grâce à l'administration d'antalgiques).

99- L'alimentation est l'une des activités principales des animaux d'élevage, et plus particulièrement chez les ruminants où la durée d'ingestion journalière peut atteindre de 5 à 9 heures par jour. La compréhension des déterminants du comportement alimentaire est donc indispensable pour mieux satisfaire les besoins psychophysiologiques des animaux. Nous focalisons notre attention sur les motivations à l'origine du comportement alimentaire (incluant l'abreuvement) et cherchons à les évaluer via un dispositif de conditionnement opérant. Les animaux seront habitués en groupe à ce dispositif de test afin de réduire la réaction des animaux à ce nouvel environnement, puis ils seront évalués individuellement. Dans un premier temps, seize caprins seront entraînés à utiliser ce dispositif dans lequel ils pourront choisir d'appuyer ou non sur un bouton poussoir pour obtenir une récompense. Puis, la motivation à obtenir une récompense sera évaluée chez les quatorze animaux les plus performants face au dispositif; le nombre d'appuis sur le bouton étant considéré comme une mesure indirecte de la motivation à obtenir la récompense. Les motivations prises en compte dans cette étude sont la faim et la soif. Elles sont induites par une privation modérée en aliment et en eau dont les effets éventuels seront contrôlés via une observation quotidienne du comportement des animaux ainsi que de leur ingestion et de leur production laitière. Les animaux seront hébergés en case individuelle afin de contrôler l'ingestion d'eau et d'aliment en continu. Ces cases autorisent néanmoins le contact physique avec les chèvres voisines et le contact visuel et sonore avec l'ensemble du troupeau, et on observera tout particulièrement les animaux, les premiers jours après leur mise en cases individuelles, pour contrôler leur adaptation.

Le nombre d'animaux impliqués dans ce projet a été réduit au maximum (16 puis 14) tout en permettant une étude fiable de la variabilité des réponses comportementales.

Le modèle animal choisi a un intérêt en tant que tel de par sa présence dans de nombreux élevages en France et dans le monde. Les caprins peuvent également être considérés comme un modèle pour les autres espèces de ruminants domestiques.

L'objectif principal de ce projet est de déterminer comment deux systèmes motivationnels (la faim et la soif) interagissent. Ce projet permettra également d'évaluer les capacités d'apprentissage des chèvres face à un tel dispositif de test.

100- Les mycoses vaginales sont des pathologies fréquentes chez la femme en âge de procréer. Les facteurs favorisant sont notamment la grossesse, les augmentations du taux d'oestrogènes, les traitements antibiotiques ... L'espèce la plus fréquemment isolée dans ce contexte est *Candida albicans*. D'autres espèces peuvent se développer sur la muqueuse vaginale, telles que *C. dublinensis*, *C. glabrata* ou *C. parapsilosis*. Un nouveau variant de *C. albicans*, « *C. africana* », a récemment été isolé en Afrique de l'ouest, puis identifié un peu partout dans le monde. Ce variant est essentiellement responsable de mycoses vaginales. Suite à une collaboration avec le laboratoire de parasitologie de Dakar, nous avons eu la possibilité d'étudier 3

souches de *C. africana* afin de les caractériser. Nous avons pu établir qu'elles possèdent un phénotype particulier comparé à celui de *C. albicans*. Afin de compléter ces résultats obtenus *in vitro*, nous devons déterminer leur pouvoir pathogène sur la muqueuse vaginale. Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer la virulence de ces souches et de la comparer à celle de souches de *Candida albicans* isolées de patientes atteintes de mycoses vaginales. Enfin, pour finaliser leur caractérisation, il nous faut aussi déterminer la sensibilité de ces souches aux traitements antifongiques de référence dans un modèle de mycose vaginale afin de déterminer les variations éventuelles de sensibilités en comparaison à celles de *C. albicans*. Malgré l'existence de protocoles permettant l'évaluation globale de la virulence de levures chez des larves d'arthropodes, ils ne permettent pas d'étudier les facteurs de virulence et de procéder au suivi longitudinal de l'évolution de la mycose. Afin de réaliser ce projet, 192 souris seront nécessaires réparties en 72 souris pour la mise au point du protocole, 24 pour l'évaluation de la virulence et 96 pour l'évaluation de la sensibilité à un antifongique.

Le nombre d'animaux a été calculé afin de pouvoir obtenir des données quantitatives suffisantes de la charge fongique vaginale pour une interprétation statistique.