



**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 (9)

801- Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 15 ans pour les sarcomes d'Ewing et 18 ans pour les ostéosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte via les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP, ...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os.

Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui à leur tour vont activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant les cellules osseuses, et plus particulièrement les ostéoclastes.

Le projet portera sur l'utilisation de différents inhibiteurs :

- L'Imatinib Mésylate est un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et dans le traitement des GIST (GastroIntestinal Stromal Tumor).
- NVP-BEZ235 est un inhibiteur des protéines mTor et PI3K.
- BYL719 est un inhibiteur spécifique de la sous unité PI3K α

Dans un premier temps, ces inhibiteurs seront testés en monothérapie, dans un modèle syngénique murin (cellule MOS-J chez la souris C57/Bl6j, 8 animaux par groupe, 1 à 3 doses testées par expérimentation). Si les résultats s'avèrent concluants ces mêmes inhibiteurs seront testés toujours en monothérapie dans un second modèle murin xénogénique (cellules HOS chez la souris NMRI Nude, 8 animaux par groupe, 1 à 2 doses par expérimentation). Ce modèle xénogénique permet de tester l'effet de ces molécules dans une tumeur humaine.

802- Les états de choc sont la première cause de décès des patients en réanimation. La mise en œuvre de thérapeutiques ciblées et adaptées à la phase initiale de la prise en charge de ces patients peut améliorer leur pronostic. Toutefois, cette prise en charge nécessite des outils de monitoring permettant une analyse fiable de l'état hémodynamique de ces patients et qui pourront aider à guider les thérapeutiques. Une parfaite connaissance et une parfaite maîtrise de ces outils sont indispensables pour les médecins réanimateurs confrontés à ces problématiques très fréquemment. Il est donc nécessaire de réaliser une formation par simulation sur l'animal qui va mimer des scénarios proches de la vie réelle pour mettre en situation les médecins en formation et leur apprendre le fonctionnement et l'interprétation du monitoring hémodynamique PiCCO qui permet la mesure invasive du débit cardiaque par technique de thermodilution et par analyse du contour de l'onde de pouls dans différentes situations d'instabilité tensionnelle : le choc hémorragique contrôlé par retrait de sang via un désilet veineux fémoral, le choc cardiogénique par injection intra veineuse d'inhibiteurs calciques. Cet enseignement par simulation animale permettra donc de former 10 médecins réanimateurs par session en utilisant un lot de 2 cochons par session et à raison de deux sessions par an. De plus, les médecins réanimateurs sont formés au placement des cathéters veineux et artériels sous échoguidage, cette technique est actuellement recommandée mais n'est pas maîtrisée par l'ensemble des médecins

803- La prise en charge de patients en état de détresse respiratoire aiguë pouvant conduire au décès du malade est une situation fréquemment rencontrée par les médecins réanimateurs et urgentistes. L'existence d'un épanchement pleural important (liquide autour du poumon) ou d'un pneumothorax (air autour du poumon) peut être à l'origine de ces situations aiguës qui nécessitent une prise en charge urgente. Le drainage thoracique qui consiste à introduire un drain dans la cavité pleurale par un abord cutané latéral après incision de la paroi thoracique est un geste d'urgence qui doit être maîtrisé par tous les médecins confrontés à ces situations d'urgence. L'acquisition de ces compétences est un impératif en terme de formation afin de garantir une prise en charge optimale des patients. La maîtrise du geste de drainage nécessite de réaliser cette procédure à de multiples reprises et par conséquent nécessite une simulation sur l'animal avant de réaliser ce geste sur l'humain. La simulation sur l'animal permet des conditions très proches de la réalité. En effet, ce modèle permet de mettre en évidence les interactions cœur-poumon lors du drainage thoracique. Le modèle porcin est le modèle le plus proche anatomiquement pour simuler le geste de drainage thoracique. Plusieurs techniques doivent être apprises en fonction de la morphologie du patient et du type d'épanchement pleural pour réaliser le drainage thoracique : technique chirurgicale, technique à mandrin exsufflation à l'aiguille, technique de Seldinger sur guide. Toutes ces techniques sont enseignées lors des sessions de formation. Deux animaux permettent de former dix médecins à ces gestes d'urgence. Quatre animaux sont anesthésiés et ventilés mécaniquement par session à raison d'une session par an. De plus, ces animaux sont également utilisés pour la formation de ces mêmes médecins à l'échographie pleuro-pulmonaire qui est une aide au diagnostic de pathologies pleuro-pulmonaires et permet de diminuer le nombre de radiographies thoraciques en service et par conséquent de diminuer l'irradiation des patients. Cette formation par simulation sur l'animal s'inscrit dans le cadre d'un diplôme inter universitaire de trauma sévère, formation qualifiante pour les médecins urgentistes et réanimateurs.

804- La tuberculose reste un problème majeur de santé publique, avec près d'un million et demi de morts par an dans le monde. La tuberculose est une maladie essentiellement pulmonaire qui se transmet par voie aérosol. *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la maladie, à l'intérieur de gouttelettes, est inhalé par toute personne proche de malades. Une fois que de telles gouttelettes ont atteint les alvéoles pulmonaires, les bactéries sont phagocytées par les macrophages alvéolaires qui sont détournés comme cellules hôtes. A l'établissement de *M. tuberculosis*, au sein de ces cellules, est couplée la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui contribuent au recrutement et à l'activation prolongés d'autres effecteurs du système immunitaire, un processus dynamique dont témoignent la formation et la maintenance de granulomes dans le parenchyme pulmonaire. Au centre de ces granulomes constitués de macrophages hôtes de *M. tuberculosis*, si certains de ces macrophages meurent, outre les bactéries, sont libérées des molécules que des senseurs présents sur les cellules locales du granulome voire sur des cellules distantes détectent et traitent. Nous avons d'abord privilégié l'hypothèse que l'ATP et ses métabolites pouvaient être des molécules libérées. A partir de monocytes humains différenciés en macrophages, infectés avec *M. tuberculosis* et exposés à de l'ATP, nous avons observé une reprogrammation de ces cellules qui pourraient contribuer à atténuer un processus inflammatoire et à réparer des lésions. En ayant recours à des souris de laboratoire consanguines génétiquement altérées ou non, nous souhaitons, maintenant, évaluer, in vivo, si la libération prolongée du contenu d'ATP et de ses métabolites, à partir de macrophages infectés - présents au centre d'un granulome- pourrait se traduire par une modulation de la réponse immune de souris qui auraient été exposées à un aérosol contenant *M. tuberculosis*. Outre une démarche reposant sur des souris déficientes pour certains gènes de la voie purinergique qui seront exposées à un aérosol contenant le bacille, d'autres démarches reposeront sur l'injection d'agonistes/antagonistes de récepteurs de cette voie ou sur l'injection d'inhibiteurs d'enzyme de la voie purinergique à des souris non transgéniques. Ce projet est conforme avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Des études in vitro ont été réalisées et seront réalisées pour limiter le recours aux animaux. Nous estimons à environ 1 500 souris le nombre de souris auxquelles nous aurons recours pendant 5 ans, estimation qui rend compte de notre volonté de minimiser au maximum le nombre de souris par groupe, tout en ne nous privant pas d'un pouvoir statistique suffisant et nous mettrons fin à l'expérimentation dès que seront détectés les premiers signes cliniques révélateurs de dommages.

805- L'environnement dans lequel se développe le fœtus a un impact sur le développement, et à plus long terme sur la santé de l'individu à l'âge adulte. L'anoxo-ischémie représente la cause majeure de troubles neuro-développementaux allant jusqu'à la paralysie cérébrale. L'encéphalopathie anoxo-ischémique est une pathologie qui survient après une asphyxie périnatale. Elle constitue un syndrome clinique se définissant comme des troubles des fonctions neurologiques dans les premiers jours de vie chez le nouveau-né. Ces troubles se manifestent par une difficulté à initier et à maintenir la respiration, une diminution du tonus et des réflexes musculaires. La spasticité est considérée comme un handicap majeur dans la paralysie cérébrale.

Face aux troubles de l'oxygénation fœtale périnatale, de nombreux travaux de recherche se sont intéressés aux mécanismes de l'hypoxie et de l'anoxo-ischémie, au niveau cérébral. Nos travaux sur l'hypoxie prénatale indiquent clairement un dysfonctionnement central de certains réseaux de neurones, les projets concernant cette thématique visent maintenant à déterminer précisément au niveau cellulaire l'impact de ce stress hypoxique sur les nouveau-nés (n=184, 12 femelles gestantes). Toutefois, les conséquences de l'asphyxie périnatale au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière sont peu connues mais pourraient expliquer certains troubles neuro-développementaux d'enfants dont

l'imagerie cérébrale serait normale. Le développement de modèles animaux présentant les déficits associés à l'encéphalopathie anoxo-ischémique est d'un intérêt majeur dans le développement de nouvelles thérapies ou l'affinement de thérapies existantes. Ainsi, nous avons développé un modèle de souris nouveau-nées âgée de 7 jours post-nataux (n=40 nouveau-nés, 7-8 portées de souris), ayant subi une hypoxie ischémique, qui se rapproche du tableau d'encéphalopathie anoxo-ischémique. Sur ce modèle il nous reste à caractériser l'impact de l'anoxo-ischémie sans reperfusion au niveau cellulaire, des études vont être menées dans ce cadre. Cette procédure nous permet d'avoir une approche de l'encéphalopathie anoxo-ischémique. Pour compléter et affiner ce modèle d'encéphalopathie anoxo-ischémique chez le rongeur, nous envisageons de développer un modèle chez le rat à la naissance présentant non seulement l'anoxo-ischémie mais également la reperfusion qui la suit chez l'homme. Ce projet sera mis en pratique chez des rats (24-25 portées), afin de pouvoir réaliser l'anoxo-ischémie dès le jour de la naissance (n=272 rats nouveau-nés) ce qui est très difficile chez les souris étant donné la taille des nouveau-nés (moins de 1g). Le protocole expérimental consiste à entraîner la formation d'un caillot, qui se dissoudra naturellement en quelques heures permettant ainsi une reperfusion des tissus. Cette reperfusion bien qu'étant bénéfique, s'accompagne d'effets délétères, une dépression neuronale liée à une libération accrue de radicaux libres et de facteurs pro-inflammatoires qui tendent à augmenter la mort cellulaire. Nous utiliserons indifféremment des mâles et des femelles afin de réduire le nombre de portées utilisées dans nos projets.

Le développement de ces modèles animaux permet d'améliorer nos connaissances des pathologies liées à une altération de la dioxygénation fœtale durant la période périnatale, de mieux comprendre les altérations neurologiques fines au niveau neuronale. Ainsi, il sera possible d'améliorer les traitements visant à réduire les impacts de des pathologies d'un point de vue moteur et de développer des traitements des troubles respiratoires afin de diminuer les manipulations lourdes (intubations, ventilation mécanique...) et contraignantes des nouveau-nés.

806- Notre entreprise travaille sur le développement de molécules thérapeutiques permettant de traiter les différents types de fibrose, qui sont un problème de santé majeur. La fibrose désigne la transformation de certains tissus en un tissu composé de fibres, proche du tissu conjonctif. Elle intervient souvent à la suite d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation d'un tissu où ceux-ci ne se régénèrent pas correctement : les tissus initialement sains sont alors remplacés par un tissu fibreux. Lors d'une lésion tissulaire, l'évolution normale se fait vers la cicatrisation, c'est-à-dire le remplacement des cellules mortes par des cellules identiques dont les fonctions sont conservées. En cas de déséquilibre du système entrant dans ce phénomène de réparation, il y a une production excessive de collagène ce qui conduit vers la fibrose. C'est à peu près le même schéma en cas d'inflammation chronique. La fibrose peut toucher de nombreux organes tels que le pancréas, le rein, la peau, le foie ou le poumon. A ce jour, aucun médicament utilisé dans le traitement de la fibrose n'a permis de guérir une fibrose établie que ce soit sur le plan histologique ou clinique. Les composés testés chez l'animal seront sélectionnés à l'aide de test cellulaires afin de minimiser leur nombre et donc dans le but d'optimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés dans les études en respect de la règle des 3R. Nous estimons à environ 10 000 animaux sur 5ans (8 650 souris et 1 350 rats) le nombre d'animaux utilisés dans les études dédiés au projet fibrose.

807- L'exposition à la pollution atmosphérique est une préoccupation majeure pour la santé publique car elle conduit à des maladies pulmonaires et cardio-vasculaires. En milieu urbain, les échappements des moteurs Diesel représentent l'une des principales sources de particules et de composés organiques. Ce projet vise à déterminer les effets toxiques d'une exposition à ces émissions, en utilisant le rat comme modèle d'étude.

L'animalerie est maintenue à une température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, à un taux d'hygrométrie de 60 à 70 %. Les animaux seront soumis à une photopériode de 12h par 24h et auront un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson. Huit groupes d'animaux (6 rats/groupes) seront exposés, en aigu et en subchronique, à différents échappements dilués de moteur diesel, alimenté en carburant standard (gasoil) ou en biocarburant (gasoil additivé d'ester méthylique de colza) et en présence ou non d'un filtre à particules. Les animaux témoins seront exposés à l'air ambiant. Les animaux seront exposés corps entier dans des cages d'inhalation conçues de façon à laisser l'animal vigilant et non contraint, tout en permettant l'inhalation aux aérosols distribués de façon homogène dans ces cages conçues, réalisées et caractérisées dans le cadre d'un projet européen antérieur. La composition de l'émission, en termes de nombre de particules, de la quantité de composés volatils, ainsi que la concentration en métaux et ions, seront surveillées en ligne pendant toute l'expérience. Aucune mesure invasive chez l'animal ne sera entreprise. Quatre groupes d'animaux seront exposés pendant 3 heures consécutives par jour, cinq jours par semaine, pendant trois semaines, à une dilution d'émission correspondant à 1 mg/m³ (sur la base du quantile 75% de la concentration obtenue dans les habitacles automobiles, soit représentative de la pollution inhalée par l'Homme). A l'issue des 3 heures d'exposition, les animaux seront replacés dans leurs cages de départ (cages standard) jusqu'à l'exposition suivante. Quatre groupes d'animaux seront également nécessaires pour évaluer l'effet d'une seule exposition aux émissions Diesel dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les expositions répétées, ainsi qu'un groupe témoin. Après euthanasie des animaux, un maximum d'organes et tissus sera prélevé afin d'optimiser le protocole expérimental et de réduire le nombre d'animaux utilisés. En fonction des résultats, une nouvelle série d'exposition sera éventuellement envisagée. La collaboration de plusieurs groupes de travail ayant des expertises complémentaires permettra de recueillir un nombre important de données sur les mêmes

échantillons qui permettront d'apporter de nouveaux éclairages sur les impacts sanitaires de la pollution, sans réitérer les expositions sur des sites différents.

808- L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie à l'origine d'une mortalité et d'une morbidité élevée dans les pays occidentaux. Au premier rang de cette surmortalité se trouvent les complications cardiovasculaires amenant la communauté scientifique à décrire un véritable syndrome cardio rénal dans lequel l'IRC altère le système cardiovasculaire qui à son tour pourra favoriser l'évolution de l'IRC. L'altération de la rigidité de l'aorte et du ventricule gauche fait partie des facteurs prédictifs importants de survenue d'évènements cardiovasculaires dans cette maladie. Les mécanismes à l'origine de ces altérations sont encore mal compris. L'utilisation de souris adultes (240 au total) comme modèle animal de la maladie permettra d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués et d'étudier l'effet de nouveaux traitements afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique de cette maladie. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux.

809- 1-Objectif scientifique du projet: Démontrer *in vivo* l'implication du gène *abcc3* (MRP3) dans le processus de tumorigénèse dans un modèle d'induction de tumeurs cutanées par carcinogénèse chimique en deux étapes: initiation DMBA et promotion TPA chez des souris KO pour ce gène.

Notre équipe étudie les mécanismes d'échappement à la sénescence impliqués dans la carcinogénèse. Plusieurs criblages perte de fonction utilisant des banques de shRNA dans des modèles de sénescence induite par un stress oncogénique ont permis d'identifier plusieurs gènes importants impliqués dans ce mécanisme, dont le gène *abcc3*.

Des travaux préliminaires au sein de notre laboratoire ont permis de valider *in vitro* son implication dans la sénescence oncogène induite: la diminution d'expression de *abcc3* induisait l'échappement à la sénescence induite par l'oncogène MEK. De plus l'expression forcée de *abcc3* induit un arrêt de prolifération associé à de la sénescence dans des lignées épithéliales et cancéreuses mammaires.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

L'observation de la base de données publique Oncomine nous montre que l'expression de *abcc3* est modulée dans les cancers de la peau et dans les cancers du colon. La démonstration de l'implication *in vivo* de ce gène dans ce modèle préclinique permettrait une meilleure compréhension des mécanismes de progression tumorale et la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques afin de restaurer l'arrêt de prolifération et la sénescence des cellules transformées.

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

- Seul un modèle *in vivo* relevant peut démontrer notre hypothèse que l'inactivation du gène *abcc3* peut favoriser le processus de carcinogénèse cutanée. Cette hypothèse a été préalablement validée *in vitro* sur des cellules en culture.

- Le modèle préclinique de carcinogénèse cutanée induite chimiquement chez des souris a été choisi car il correspond à un modèle où la sénescence est bien décrite. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

- Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats: fréquence d'apparition de tumeurs cutanées post traitement chimique par rapport aux groupes contrôles de même génotype. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentale en classe de gravité modérée.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total 75 souris de différents génotypes (wt, KO hétéro ou KO homozygotes pour le gène *abcc3*) sont incluses dans ce projet. Les souris transgéniques élevées au sein de l'EU n'ont pas de phénotype nocif en absence de traitement chimique.

810- La maladie cardiovasculaire est une cause majeure de mortalité chez les populations diabétiques de type 2. Des modifications du stress oxydant et de la voie de signalisation de l'oxyde nitrique (NO) participent aux dysfonctions et à la vulnérabilité accrue du cœur à l'infarctus. Ce travail évaluera la participation d'un autre gaz, la voie de signalisation du monoxyde de carbone (CO), dans cette maladie cardiométabolique et l'interaction potentielle entre ces deux voies. En effet bien que le taux de CO endogène augmente chez les diabétiques et soit un facteur prédictif du risque cardiovasculaire, son rôle biologique demeure méconnu. De plus, nous avons pu montrer qu'une exposition à de faibles doses de CO était à l'origine d'un remodelage des cellules du cœur rendant celui-ci plus vulnérable à un stress aigue tel que l'ischémie-reperfusion (infarctus du cœur). L'objectif de cette étude est d'évaluer, chez une population de souris rendu diabétique de type 2, le rôle de la production endogène de monoxyde de carbone (CO) par l'enzyme hème-oxygénase (HO-1) dans le développement d'un phénotype cardiaque plus sensible à l'ischémie-reperfusion.

Nous étudierons donc 1) le rôle du CO dans le développement de la cardiomyopathie diabétique et de l'hypersensibilité du cœur à l'ischémie, 2) l'interaction entre les voies de synthèse et de signalisation du CO et du NO et 3) comment la modulation de la synthèse de CO endogène par des stratégies anti-oxydantes permet de prévenir certaines complications liées au diabète de type 2 (dont principalement la sensibilité accrue du cœur à l'ischémie-reperfusion).

Ainsi, à partir de souris rendus diabétiques de type 2 (225 souris au total), i) nous évaluerons la fonction cardiaque par suivi écho-cardiographique ; ii) à partir d'échantillons de cœur prélevés en fin de procédure expérimentale, nous nous intéresserons aux effets de la pathologie, associée ou non à des traitements antioxydants, sur la modification d'expression et/ou d'état fonctionnel de certaines cibles cellulaires clés dans la régulation de la fonction contractile

cardiaque ; et enfin iii) à partir d'un modèle de cœur isolé perfusé, permettant de standardiser les conditions de fonctionnement de cet organe et ainsi de limiter le nombre d'animaux à utiliser, nous évaluerons la sensibilité du cœur à un infarctus (ischémie-reperfusion myocardique).

Notre but est de proposer/valider de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la cardiomyopathie diabétique.

811- La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables d'hydrolyser les bêta-lactamines, les bêta-lactamases. On assiste actuellement à une dissémination au niveau mondial de ces enzymes de résistance.

La stratégie la plus efficace pour restaurer l'activité des bêta-lactamines est l'utilisation d'inhibiteurs de bêta-lactamases en association avec des bêta-lactamines. Au contraire des inhibiteurs disponibles (acide clavulanique, tazobactam, et sulbactam), l'avibactam (NXL 104) est une nouvelle classe d'inhibiteur avec virtuellement aucune activité intrinsèque et qui ne contient pas de noyau bêta-lactame.

La ceftaroline est une nouvelle céphalosporine à large spectre, qui montre une activité bactéricide temps-dépendante sur les bactéries à la fois à Gram positif et Gram négatif. En revanche, cette molécule est inactive sur les souches productrices de bêta-lactamases. En association avec la ceftaroline, l'avibactam serait capable de restaurer l'activité de la céphalosporine vis-à-vis des bactéries multirésistantes.

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité de l'association ceftaroline/avibactam dans un modèle d'infection urinaire expérimentale et de comparer cette activité à une molécule de référence, le doripénème (carbapénème).

Il est indispensable de pouvoir avoir une démonstration in vivo de l'efficacité de cette nouvelle option thérapeutique, qui pourrait représenter une des rares options encore actives sur certaines entérobactéries multirésistantes fréquemment isolées dans les infections urinaires compliquées

812- La cachexie cancéreuse, secondaire au développement du cancer, est un syndrome regroupant plusieurs symptômes, caractérisé notamment par une perte de poids corporel dramatique. Celle-ci résulte principalement d'une perte de masse musculaire et de masse adipeuse. La cachexie liée au cancer réduit la qualité et la durée de vie des patients et peut diminuer l'efficacité des traitements.

L'objectif de ce projet est de définir une stratégie permettant de lutter contre la mise en place d'un syndrome cachectique au cours du cancer. Le recours à l'expérimentation animale permet d'étudier l'ensemble des mécanismes impliquant différents tissus (le muscle, le tissu adipeux et la tumeur). Il existe d'ores et déjà des modèles de souris qui développent après altération de leur génome un cancer de type colorectal. Ces souris sont utilisées de part le monde depuis plusieurs années et sont donc bien connues du point de vue physiopathologique.

Des travaux antérieurs, ont montré qu'une intervention expérimentale visant à développer la masse musculaire avant le développement de tumeurs permettait de limiter la cachexie chez les souris et pouvait même améliorer la durée de vie des animaux. L'approche que nous souhaitons mettre en place est totalement nouvelle mettant en jeu manipulation génétique ou administration de substances dérivées de la pharmacologie. Globalement, ces expériences visent à augmenter la masse musculaire des souris cancéreuses afin de leur procurer une meilleure résistance au développement de la maladie. Ceci pourra également contribuer à une meilleure tolérance et réponse aux traitements directement ciblés contre le cancer. De façon ultime, la qualité et la durée de vie doivent s'en trouver significativement améliorées.

Un total de 148 souris sera nécessaire à la réalisation de ce projet. Nous constituerons un « groupe thérapie » où les souris subiront une injection hebdomadaire par voie sous-cutanée d'une substance pharmaceutique visant à augmenter leur masse musculaire alors que le cancer s'est déjà mis en place. Cette injection sera effectuée sur une durée maximale de 10 semaines. Les souris seront suivies tout au long de leur vie au niveau de leur poids, de leur comportement moteur et de leur force musculaire. Il s'agit donc de méthodes non invasives. Un certain nombre de critères physiologiques et comportementaux sont définis afin de s'assurer de l'absence de souffrance des animaux avant la fin de leur protocole respectif.

813- Afin d'améliorer la qualité des vaccins de nouvelle génération, il est essentiel de comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans leur efficacité. Les vecteurs lentiviraux sont des candidats prometteurs dans le développement de nouveaux vaccins prophylactiques et thérapeutiques car il a été montré que ces vecteurs induisent de fortes réponses immunitaires protectrices. L'étude de leur efficacité au niveau des phases précoces de la réponse immunitaire est essentielle pour comprendre les mécanismes de l'induction de ces réponses qui permettront d'améliorer les performances de futurs vaccins. Le but de ce projet est de caractériser le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et conventionnelles (cDC), lors de l'induction d'une réponse immunitaire suite à une vaccination basée sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux.

Dans le cadre de cette étude, des essais sur modèles murins génétiquement modifiés ou non sont nécessaires afin de pouvoir déterminer les facteurs indispensables à l'induction d'une réponse immunitaire efficace protectrice à long terme en présence ou en absence de pDC ou cDC dans des conditions physiologiques. Approximativement 800 souris seront utilisées pour ce projet. Ce nombre est adapté pour atteindre l'objectif du projet avec des résultats statistiquement

acceptables permettant d'apporter des réponses définitives aux questions posées dans ce projet. Les protocoles sont établis afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées. Ces essais auront pour finalité le développement de vaccins plus efficaces et plus sûrs dans le traitement de nombreuses pathologies humaines.

814- Nous avons développé un système portatif d'imagerie en fluorescence pour assister le chirurgien lors de l'exérèse de tumeurs afin d'améliorer la qualité de l'exérèse et éviter la récurrence loco-régionale. L'appareil d'imagerie est maintenant commercialisé et certifié «CE Medical ». Notre équipe a aussi développé et breveté un assemblage moléculaire qui cible spécifiquement les tumeurs.

Le but de ce projet est de démontrer maintenant si cette technologie est performante pour améliorer la qualité de la résection du mélanome. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme pour la chirurgie des cancers de la peau assistée par imagerie optique. En effet, les tumeurs cutanées peuvent être localisées dans des zones fonctionnelles de haute importance. Leur résection doit donc être particulièrement économe pour limiter le préjudice esthétique et fonctionnel. La chirurgie assistée par l'imagerie de fluorescence pourrait être très utile dans cette indication. Elle permettrait de cibler l'exérèse uniquement à la zone tumorale et donc de diminuer la morbidité opératoire et les séquelles fonctionnelles.

Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 4 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations. Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Si une perte de poids supérieure à 20% est observée ou si l'animal montre des signes de souffrance (isolement, prostration...), l'euthanasie de l'animal sera réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie gazeuse.

Dans ce projet nous utiliserons 50 souris Nude dans lesquelles le mélanome malin est implanté en intradermique. Cela représente 10 lots de 5 souris, dans lesquels nous évaluerons : le temps entre injection et acquisition (3 groupes : injection 2j, 1j, ou 5h avant acquisition), la dose injectée (4 Groupes : 10, 5, 1 ou 0.5 nmole) et nombre de points d'injections (3 groupes : 2, 3 ou 4 points d'injections). Les souris anesthésiées sous anesthésie gazeuse reçoivent une injection intradermique de 30 µl de solution isotonique contenant les cellules tumorales. Durant l'anesthésie, la température corporelle est maintenue sur un tapis chauffant. Les souris sont replacées dans leurs cages et se réveillent spontanément. Elles sont particulièrement surveillées pendant cette phase de réveil. La qualité du marquage de la tumeur est ensuite visualisée par imagerie non invasive de fluorescence.

Il n'existe aucun modèle in vitro qui pourrait remplacer l'utilisation de ces souris.

Ceci nous permettra de vérifier la pertinence de cette nouvelle technologie pour améliorer la qualité de la chirurgie du mélanome

815- Nous avons mis en évidence que les souris femelles KO d'un récepteur de chimiokines étaient infertiles que les mâles KO étaient hypofertiles. De plus, la distribution des KO dans les portées n'est pas mendélienne, ce qui suggère une mortalité intra-utérine. Les animaux KO présentent aussi des défauts anatomiques de la glande mammaire, de l'utérus et de l'ovaire. Le but du projet est de comprendre les mécanismes d'action de ce récepteur de chimiokines. Le but du projet est de déterminer

si les femelles hétérozygotes croisées avec des mâles hétérozygotes produisent des blastocystes WT, hétérozygotes et KO dans des proportions mendéliennes.

si l'implantation utérine des œufs est affectée par leur phénotype.

si la transplantation d'ovaire ou de glande mammaire des animaux KO dans des animaux sauvages permet de restaurer leur fonction.

Un total de 76 souris Balb sauvages, KO ou hétérozygotes pour ce récepteur sera nécessaire.

816- Le développement post-embryonnaire est fortement lié à la signalisation des hormones thyroïdiennes (HT). Les HT sont capables d'exercer de multiples rôles sur différents tissus. Elles régulent divers processus cellulaires: division, mort, métabolisme ou croissance. Les HT déclenchent des cascades de régulations modifiant l'expression de plusieurs gènes. Un des effets les plus marquants des HT est leur rôle critique dans la métamorphose chez les amphibiens. La métamorphose marque la fin de la période larvaire et se caractérise par la transformation morphologique abrupte en un état juvénile. Elle correspond aussi presque toujours à une transition écologique (changement de milieu de vie). La cascade des événements moléculaires initiant la métamorphose est bien connue chez les amphibiens Anoures. Le développement post-embryonnaire est en revanche très peu connu chez les amphibiens qui ne se métamorphosent pas et chez lesquels il peut être remarquablement divers. L'objectif de ce projet est premièrement l'étude comparée, par des études à l'échelle du génome, des acteurs moléculaires mobilisés au cours de l'initiation de la période post-embryonnaire des amphibiens se métamorphosant et ceux ne se métamorphosant pas. Ici, il s'agit de déterminer les acteurs moléculaires dans une espèce d'urodèle néoténique de la famille des *Ambystomatidae* (*Ambystoma mexicanum*).

L'approche expérimentale est basée sur une nouvelle technologie dont l'analyse des résultats permet de déterminer l'ensemble des gènes exprimés dans un tissu/organisme sans connaître a priori la séquence du génome. Il est indispensable de réaliser ce projet dans le contexte physiologique de l'animal entier car il n'existe pas de modèle *in vitro* pour la mise en œuvre de ce projet et la mise au point de ce type de modèle *in vitro* serait trop consommatrice en animaux pour un besoin limité. Le projet nécessitera six lots d'animaux correspondant à deux conditions physiologiques (traitement par les HT et sans traitement), soit 90 animaux au total. Les deux premiers lots serviront à l'analyse à l'échelle du génome et les cinq derniers pour la validation des résultats. Le nombre d'animaux utilisé lors de la première préparation d'échantillons biologiques se fera en tenant compte de nos connaissances sur un modèle d'amphibien Anoure métamorphique de la famille des *Pipidae* (*Xenopus tropicalis*) et la masse de tissus que nous pouvons isoler. Ainsi, nous pourrions ensuite déterminer précisément les possibilités de réduction du nombre d'animaux nécessaire dans les autres lots. Il est aussi important de noter que les améliorations technologiques des analyses moléculaires pourront permettre de diminuer ce nombre. Enfin, l'expérimentateur prendra soin de prélever le maximum d'organes différents sur le même individu.

Ces informations seront dans un deuxième temps analysées dans le contexte de la période périnatale chez l'homme. En effet, la perturbation du signal HT pendant cette période correspondant au développement post-embryonnaire entraîne des pathologies de la naissance au vieillissement. En particulier, l'exposition à un stress à la naissance peut programmer l'expression de certains gènes en direction de maladies, maladies dont l'impact sociétal est considérable (cancer, obésité, diabète, maladies cardiaques ou encore dysfonctionnement cérébral). Nos travaux devraient permettre d'identifier des acteurs moléculaires à l'origine de ces pathologies.

817- La paroi de *Candida albicans* est le point de contact entre la levure et l'hôte. C'est une structure complexe et dynamique contenant différents oligo et polysaccharides qui ne sont pas seulement importants pour son maintien mais qui ont également de nombreux rôles biologiques comme l'adhérence et l'immunomodulation. Parmi ces glycannes pariétaux, se trouve des oligomannosides présentant des liaisons β -1,2 mannosidiques (β -1,2 Mans) rares dans le monde vivant. Durant l'infection à *C. albicans*, les β -1,2 Mans jouent un rôle important dans les interactions hôte/pathogène en agissant comme adhésine et en interférant avec les réponses immunitaires de l'hôte. Des études ont montré que l'expression des β -1,2 Mans est hétérogène à la surface cellulaire, varie selon les souches de *C. albicans* et peut être modulée par différents facteurs environnementaux. Les β -1,2 Mans, qui sont biosynthétisés par une famille de 9 β -1,2 mannosyltransférases spécifiques du substrat et de l'étape de β -1,2 mannosylation, ont été trouvés associés à différents glycoconjugués : le phosphopeptidomannane (PPM), le phospholipomannane (PLM) et les mannoprotéines. De multiples mutants *bmtsΔ* exprimant des β -1,2 Mans sur des glycoconjugués spécifiques ont été générés afin de déterminer le rôle respectif des glycoconjugués β -1,2 mannosylés dans les différentes étapes d'infection à *C. albicans*. Pour cela des tests de virulence seront établis sur des souris BALB/c et C57BL/6(Gal3+/+ et Gal3-/-) avec une estimation de 60 animaux par souche (10 souches seront testées). La virulence sera évaluée par des tests de survie ainsi que l'estimation de la charge fongique dans les organes après infection par les différentes souches. L'expression des gènes BMTs de *C. albicans* et des gènes murins codant pour les cytokines pro- et anti- inflammatoires sera également analysée dans les organes au cours de l'infection.

818- Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. L'athérosclérose entraîne une obstruction progressive des artères et parfois des complications thrombotiques aiguës.

L'infarctus du myocarde (IDM) est une nécrose ischémique systématisée du muscle cardiaque dont l'incidence est de 120 000 cas en France et responsable encore de 10 à 12% de la mortalité annuelle chez l'adulte. La revascularisation coronaire chirurgicale ou pontage coronaire est estimée à 13528 procédures entre le 01/01/2010 et 31/10/2010 selon la base de données élémentaires Epicard de la SFCTCV (Société Française de Chirurgie Thoracique et Vasculaire). L'utilisation des 2 greffons ATI concerne moins de 4% des patients revascularisés aux USA. Dans la pratique, les greffons saphènes restent largement utilisés avec un risque d'occlusion survenant la première année estimée de 15% à 26% selon les auteurs.

L'hyperplasie intimale à l'origine des sténoses et occlusion des greffons saphènes ou « maladie du greffon » est la résultante de l'accumulation des cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire dans l'intima de la veine. Cette hyperplasie intimale est à l'origine des récurrences d'ischémie myocardique. L'altération du fonctionnement endothélial résulte de l'activation plaquettaire et joue également un rôle important dans le risque d'occlusion tardive.

Plusieurs paramètres ont été retrouvés pour expliquer l'altération de la structure et de la fonction des greffons veineux:

- La qualité du greffon (varices, dilatation)
- Les modalités de prélèvements, à ciel ouvert ou endoscopique, cette dernière méthode ayant débouché sur des résultats médiocres de perméabilité à 1 an
- La durée entre le prélèvement et la reperfusion, correspondant à la durée d'ischémie tissulaire qui peut parfois varier entre 1 à 2 heures, et la production de lésions radicalaires in-situ
- La composition et la température du liquide de conservation du greffon saphène.
- La technique de suture distale des anastomoses coronaires, les anastomoses veineuses séquentielles donnant de moins bons résultats à 1 an de suivi que les anastomoses termino-latérales simples

- Enfin, le positionnement de l'autogreffe veineuse en position artérielle soumet l'endothélium à des niveaux de pression pouvant endommager les pontages

Le but de notre étude est de tester différentes solutions de conservation des greffons veineux utilisés en pratique courante en chirurgie coronaire: sérum hépariné ou sang autologue hépariné ou solution antioxydante comme la solution GALA (Glutathion, Acide Ascorbique, L-Arginine). Des veines caves inférieures (VCI) de rats syngéniques donneurs (72 rats) seront prélevées, conservées dans les différentes solutions décrites ci-dessus, pour être ensuite réimplantées au niveau d'aorte abdominale de rats receveurs (72 rats). Un total de 144 rats mâles Lewis sera nécessaire pour cette étude. La veine sera alors soumise à des régimes de pression artérielle et laisser en place pendant 1 ou 6 semaines (5). L'utilisation de rats syngéniques est motivée par la réalisation de greffe veineuse ce qui permettra d'appréhender toute réaction immunitaire. L'utilisation de 12 rats par groupe (cf. schéma de l'étude 3.3.2) permettra de réaliser des manipulations de faisabilité et d'atteindre l'objectif principal.

Cette étude permettra d'identifier les facteurs et les solutions prédisposant au risque d'hyperplasie intimale à l'origine des sténoses précoces des greffons veineux. Une étude de la viabilité et fonctionnalité endothéliale ainsi que la vasoréactivité induite par la pulsatilité et la pharmacologie sera réalisée sur les greffons.

819- Les événements climatiques tels que les sécheresses estivales induisent une forte variabilité de qualité et de disponibilité des fourrages au cours et entre les années. Les systèmes d'élevage de ruminants ont besoin d'animaux adaptés à ces aléas (induisant des périodes de restriction d'apports de nutriments riches en énergie) y compris à des périodes où les animaux ont de forts besoins énergétiques (gestation, lactation, croissance). Disposer d'animaux mieux adaptés à la valorisation de fourrages de moindre qualité résulte d'une volonté de réduire les aliments concentrés (pour des raisons économiques et environnementales, et pour limiter la compétition avec l'alimentation humaine dans le cas des céréales).

Notre objectif est d'étudier les effets d'une diminution des apports en nutriments via l'alimentation de la mère avec des fourrages de moindre qualité pendant la gestation, sur les capacités d'adaptation du jeune à une même situation rencontrée plus tard dans sa vie. Nous testons l'hypothèse qu'un animal adapté valorisera mieux un fourrage de mauvaise qualité et sera moins affecté (métaboliquement, physiologiquement et psychologiquement) par des épisodes de variabilité de la qualité des fourrages. L'objet d'étude est l'animal et l'objectif final est d'améliorer l'élevage, d'où la nécessité d'utiliser des animaux d'élevage pour ce projet, en l'occurrence des ovins.

Les réponses adaptatives seront analysées chez la mère et les jeunes au niveau métabolique, physiologique, digestif, comportemental et/ou zootechnique et permettront de répondre à des questions scientifiques interdisciplinaires. Trois lots de 15 brebis Romane (race allaitante) seront constitués pour appliquer trois traitements nutritionnels. L'effectif permet de faire trois sous-lots au sein de chaque lot pour optimiser la puissance des tests statistiques. Les animaux seront maintenus en groupes de cinq, un effectif adéquat pour ces animaux grégaires. Les trois traitements correspondront à alimenter chaque lot ad libitum avec des fourrages de trois qualités différentes de 2.5 à 4.5 mois de gestation. Le lot 'Contrôle' recevra un fourrage de très bonne qualité (regain), le lot 'Restreint' un fourrage de qualité moyenne (foin de 1er cycle végétatif jeune), et le lot 'Restreint+' un fourrage de mauvaise qualité nutritionnelle (foin de 1er cycle végétatif âgé). Les contraintes résultent du niveau de restriction alimentaire induit par la consommation des fourrages de moyenne et mauvaise qualité et évolutif avec l'augmentation des besoins énergétiques des brebis au cours de la gestation. La restriction s'arrêtera deux semaines avant la date d'agnelage pour ne pas faire échouer la gestation. Une complémentation limitée est prévue si la note d'état corporel de 50% de l'effectif des brebis devient inférieure à 1.5. Les autres contraintes seront liées aux mesures (prises de sang, étude du comportement et des capacités digestives) réalisées sur les brebis et leurs agneaux, et pour lesquelles des points de contrôles et d'interruptions sont prévus. Un suivi quotidien de l'état et du comportement général des animaux ainsi qu'un relevé hebdomadaire du poids et de leur note d'état corporel permettra d'ajuster les traitements pour la réussite du protocole et éventuellement de réduire la contrainte appliquée à un animal et de le retirer de l'expérimentation si les critères d'exclusions sont atteints.

820- L'objectif de ce projet est de produire un médicament à usage humain à partir de sérum de lapins.

L'Autorisation de Mise sur le Marché définit le protocole de production du médicament et comme tout dossier réglementaire lié à l'agrément d'un médicament, elle fixe les modalités d'obtention de la matière active.

Le recours au lapin en tant que producteur d'Anticorps polyclonaux a été évalué en son temps lors du développement du produit. La procédure a été définie pour obtenir la plus grande quantité de matière active par animal et donc afin de limiter le nombre de sujets utilisés (80 à 100 animaux par série, 312 séries/an donc 156 000 lapins sur 5 ans).

Depuis la création de cette activité les méthodes de production ont été constamment améliorées pour intégrer toutes les réglementations s'appliquant à l'expérimentation animale (hébergement, formation du personnel, prise en compte de la souffrance animale).

821- La fièvre catarrhale, maladie grave des ruminants, est causée par un virus appelé Bluetongue virus (BTV). Ce virus est transmis par des moucheron piqueurs appartenant au genre Culicoides. Depuis 1998, le BTV s'est propagé en Europe, une propagation en corrélation directe avec l'extension de l'aire géographique de ses vecteurs et sans doute une conséquence du réchauffement climatique global. Entre 1998 et 2005, au moins six souches virales appartenant à cinq

sérotypes (BTV 1, 2, 4, 9 et 16) ont été continuellement présentes dans le bassin méditerranéen. En 2006- 2007, l'émergence de BTV-8 dans le centre et le nord de l'Europe fut la plus importante épidémie enregistrée dans l'histoire de la fièvre catarrhale du mouton, conduisant à la mort de plus de 2 millions d'animaux avec un impact désastreux sur les activités agricoles et entraînant d'importantes pertes économiques en Europe. En culture cellulaire, nous avons pu observer d'importantes variations sur le cycle de BTV selon le génome viral considéré (issu de différents sérotypes ou souches virales). Il est donc très important de déterminer, in vivo chez le mouton, l'impact de ces différents génomes sur les signes cliniques au cours de l'infection. Connaître les facteurs modulant la pathogénicité de ce virus permettra de mieux évaluer les risques liés aux différents sérotypes ou souches virales de BTV et donc de mieux prévenir et lutter contre cette maladie.

Pour un essai vaccinal typique dans l'espèce cible, ici le mouton, nous utilisons 15 animaux traités et 15 animaux témoins ce qui est la taille minimale de l'échantillon nécessaire pour étudier les mécanismes de protection si le vaccin protège 50 % des animaux même si une protection naturelle de l'ordre de 10% est présente dans la population. Par ailleurs, dans la majorité des cas, la maladie provoque une fièvre et des signes bénins avant une guérison complète. L'impact de cette étude, même sur les animaux non vaccinés demeure donc limité.

822- Nous définissons des vecteurs pour le diagnostic, la thérapie ciblée et la définition des limites des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS). Nous avons déjà testé et validé des molécules dans plusieurs modèles cellulaires in vitro. Nous devons maintenant étudier la biodistribution de ces vecteurs et évaluer si leur utilisation, couplée à des techniques d'imagerie optique, améliore la qualité de la résection tumorale in vivo. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 4 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations. Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Des cellules tumorales humaines de cancer des VADS peuvent être implantées en orthotopique au niveau du plancher buccal et de la langue des souris. Cependant, la forte progression tumorale dans ce modèle orthotopique, due à la dissémination tumorale importante créée par pression hydrostatique lors de l'injection cellulaire, est incompatible avec une alimentation normale, ce qui limite l'étude des métastases et la détection d'une éventuelle efficacité thérapeutique des nouvelles molécules testées.

Pour cette raison, nous réaliserons des implantations intra-jugales de copeaux tumoraux obtenus à partir de tumeurs des VADS sous-cutanées. Une tumeur implantée en sous-cutané chez la souris Nude permettra l'implantation de tumeurs orthotopiques chez 6 souris. Ce modèle orthotopique permettra de ralentir la croissance tumorale et d'augmenter la survie des souris.

Dans ce projet nous utiliserons 60 souris Nude :

- Premièrement, nous évaluerons la biodistribution par imagerie optique non invasive des meilleurs vecteurs validés in vitro (7 molécules), dans le modèle orthotopique de cancer des VADS. D'après notre expérience, 3 animaux par condition expérimentale permettent une analyse fiable de la biodistribution, prenant en compte les variabilités inter-individu. Nous implanterons donc des tumeurs humaines sous-cutanées chez 4 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 21 souris.

- Deuxièmement, nous comparerons la qualité de la résection tumorale aidée de l'imagerie de fluorescence, après injection de molécule fluorescente par voie intraveineuse ou péritumorale, à la résection macroscopique (3 groupes). Nous réaliserons l'exérèse des tumeurs sans toucher à l'intégrité de la langue, ce qui permettra la survie des souris après l'explantation tumorale. Nous surveillerons l'apparition de métastases ganglionnaires cervicales ou une rechute tumorale par imagerie optique. Les marges d'exérèse de la tumeur seront analysées histologiquement pour estimer si l'imagerie permet d'améliorer la qualité de l'exérèse. 10 souris par condition sont nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous implanterons donc des tumeurs humaines sous-cutanées chez 5 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 30 souris.

823- Nous avons démontré que des combinaisons de traitements contrecarrent la résistance aux thérapies ciblées dans le cancer du poumon, Notre objectif est d'évaluer l'intérêt pour le traitement du cancer du poumon de transporter des molécules thérapeutiques avec des nanoparticules qui ciblent le récepteur CD44, Nous avons déjà testé et validé ces molécules dans plusieurs modèles cellulaires in vitro, Nous devons maintenant étudier la biodistribution et l'efficacité thérapeutiques de ces nanoparticules in vivo,

Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 4 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations.

Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine.

Des cellules tumorales pulmonaires humaines exprimant ou non le récepteur CD44 seront implantées dans les poumons de souris. Nous planterons les cellules tumorales sur 4 animaux pour obtenir, d'après notre expérience, au moins 3 animaux avec une prise de tumeur au niveau pulmonaire. La croissance des tumeurs pulmonaires sera suivie par imagerie de bioluminescence et n'entraîne pas de gêne respiratoire. Les souris sans prise tumorale seront utilisées dans un autre protocole. Si plus de 3 souris ont une tumeur pulmonaire, elles seront utilisées et le lot suivant diminué d'autant.

Dans ce projet nous utiliserons 250 souris Nude :

- Premièrement, nous analyserons par imagerie de fluorescence la biodistribution de molécules entrant dans la composition des nanoparticules, puis de nanoparticules de 2 tailles différentes, administrées par voie aérienne (nébulisation) ou intraveineuse (soit 2 voies d'administration et 4 molécules = 8 conditions), dans des souris avec des tumeurs pulmonaires CD44+ ou CD44- ou dans souris saines. D'après notre expérience, 3 animaux par condition expérimentale permettent une analyse fiable de la biodistribution, prenant en compte les variabilités inter-individu. Nous planterons donc des tumeurs pulmonaires dans 64 souris pour obtenir 24 souris avec des tumeurs orthotopiques CD44+ et 24 souris avec des tumeurs orthotopiques CD44-. Nous utiliserons également 24 souris saines. Soit 88 souris.

- Deuxièmement, nous évaluerons par imagerie optique, l'efficacité thérapeutique sur la régression de tumeurs pulmonaires, des meilleures nanoparticules chargées avec une combinaison de molécules thérapeutiques, par rapport aux traitements seuls, aux nanoparticules seules et à un groupe contrôle (soit 4 groupes). 10 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable de l'effet anti-tumoral. Nous planterons donc des tumeurs pulmonaires dans 54 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 40 souris. Nous répéterons le protocole (n=3) afin d'optimiser les concentrations des molécules thérapeutiques chargées dans les nanoparticules. Nous planterons donc des tumeurs pulmonaires dans 162 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 120 souris.

824- Le traitement curatif de la peste, maladie considérée comme ré-émergente par l'OMS, repose sur l'administration précoce d'antibiotiques de 1ère ligne tels que les aminosides, les cyclines et les fluoroquinolones. Des souches de *Y. pestis* résistantes à ces antibiotiques ont été isolées chez des patients. C'est pourquoi, de nouveaux antibiotiques dirigés contre des nouvelles cibles bactériennes non concernées par les mécanismes de résistance actuels tels que les inhibiteurs de l'enzyme LpxC sont actuellement en développement. LpxC est une enzyme impliquée dans la synthèse du lipide A, un composé majeur du lipopolysaccharide bactérien. In vitro, nous avons observé que les anti-LpxC étaient actifs vis-à-vis de plusieurs souches de *Y. pestis*, stables dans les microsomes hépatiques et dépourvus de toxicité cellulaire. L'expérience montre que la corrélation entre activité in vitro et activité in vivo est loin d'être satisfaisante car la proportion d'antibiotiques actifs in vitro et qui le restent in vivo est inférieure à 2%. C'est pourquoi, il est admis par la communauté scientifique d'utiliser des modèles rongeurs pour étudier le profil toxicologique complet, la pharmacocinétique et le potentiel antibactérien des antibiotiques avant d'envisager les 1ères administrations à l'homme.

L'objectif de notre projet consiste à étudier l'efficacité des anti-LpxC, in vivo, dans un modèle murin (chez la souris) de peste. Pour cela, des groupes réduits de 5 à 8 souris seront utilisés pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques des anti-LpxC, la dose protectrice 50 et protectrice maximale et leurs effets bactériostatiques et/ou bactéricides dans un modèle murin de peste bubonique et septicémique. Au maximum, 217 souris par molécule d'anti-LpxC testée seront utilisées.

Le nombre d'animaux par groupe ne peut pas être en-dessous de 5 afin de ne pas compromettre la puissance des tests statistiques.

Les animaux seront manipulés individuellement à l'isolement afin d'éviter tout stress aux animaux non manipulés. Après l'infection, les animaux seront observés quotidiennement pendant toute la durée d'expérimentation. Tout animal sera sacrifié (par overdose d'isoflurane) en cas de signes terminaux de la maladie (reluctance au mouvement, poil hérissé, yeux mouillés, prostration, absence de réaction aux stimuli extérieurs). Il est à noter que la peste est une maladie dont les symptômes apparaissent brutalement et il n'est pas rare qu'un animal qui ne présente aucun signe clinique évident succombe à la maladie dans les 12 heures suivant la dernière observation.

Comme nous suivrons l'effet d'un traitement antibiotique sur un processus infectieux, les médications analgésiques et anti-inflammatoires ne pourront pas être utilisées car elles interfèrent avec ce processus.

825- Les caractéristiques du microenvironnement tumoral obligent les cellules à remodeler leur métabolisme afin de s'adapter aux stress nutritionnels. Ainsi, les cellules tumorales à croissance rapide vont promouvoir une glycolyse exacerbée qui va assurer tous les éléments énergétiques (ATP) et nutritifs nécessaires à leur prolifération. Cependant, elle va également provoquer une production accrue d'acide lactique, dont l'export est crucial pour la survie des cellules tumorales. Cet export est assuré par des transporteurs membranaires, les MCTs (MonoCarboxylate Transporters), dont l'expression membranaire nécessite la liaison avec une protéine chaperonne : Basigine. Cette glycoprotéine transmembranaire est très fortement exprimée dans plusieurs types tumoraux. Puisque l'acide lactique est le dernier produit de la voie glycolytique, nous avons proposé qu'inhiber son export serait une approche radicale pour inhiber la glycolyse et donc la production majeure d'ATP des cellules tumorales. Ainsi, nous avons démontré sur le modèle d'adénocarcinome de côlon LS174, que le ciblage des MCTs et/ou Basigine induit une très forte réduction de la croissance tumorale. Néanmoins, si le blocage de l'export d'acide lactique réduit fortement le développement tumoral, cette action

ne se fait pas par mort cellulaire mais par arrêt de la croissance. Afin d'expliquer la résistance de ces cellules au stress métabolique, nous avons émis deux hypothèses, constituant nos grands axes d'expérimentation animale : 1) – les cellules tumorales auraient réadapté leur métabolisme en effectuant un « switch » de la glycolyse vers la respiration. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences *in vitro*, qui nous ont permis de démontrer qu'un traitement combinant l'inhibiteur des MCTs et la Phenformine, un analogue perméable de la metformine utilisée pour le traitement du diabète et inhibant la respiration, induit un effet délétère (mort cellulaire) sur différentes lignées cellulaires tumorales invalidées pour les transporteurs MCTs et/ou Basigine. Afin de généraliser cette stratégie thérapeutique à toutes les tumeurs glycolytiques, nous voudrions l'appliquer *in vivo* sur des modèles cellulaires tumoraux agressifs, et pour lesquels les cliniciens n'ont aucun traitement efficace. Parmi ces cancers, il y a la leucémie myéloïde chronique (LMC). En effet, les patients atteints de LMC sont maintenant traités avec de l'IMATINIB, mais l'émergence de clones résistants au traitement représente un challenge important pour les cliniciens. Nous postulons que ces formes résistantes et agressives de LMC sont hautement glycolytiques et pourraient être stoppées en induisant une catastrophe métabolique : ciblage de l'export d'acide lactique associé à l'action de la phenformine. 2) - l'AMP-kinase « gardienne » du niveau d'ATP est responsable de cette survie tumorale. En effet, cette kinase peut détecter et rétablir la moindre diminution du niveau intracellulaire d'ATP. La stratégie que nous voulons valider serait de mener en parallèle : blocage des MCTs (synthèse d'ATP), et blocage de l'activité AMPK de manière à entraîner un effondrement de l'ATP intracellulaire. Nos résultats, *in vitro*, démontrent que la double inhibition MCTs/AMPK a des effets drastiques sur la prolifération/mort cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris transformés par l'oncogène H-RAS. Afin de démontrer la pertinence de nos stratégies comme des futures thérapies anti-cancer, valider *in vivo* nos résultats préalablement obtenus *in vitro*, et appréhender les effets de la combinaison de nos différents traitements sur un organisme intégré, ce protocole d'étude chez l'animal nous est absolument nécessaire. Les animaux utilisés dans ces études sont des souris Nude NMRI-nu femelle de 6 semaines (780 souris). Ce modèle expérimental que nous connaissons parfaitement et pour lequel le laboratoire a développé une réelle expertise va nous permettre de respecter les exigences de réduction de nombre d'animaux puisqu'il a été utilisé lors d'études pilotes pour déterminer la quantité de cellules à injecter, le pourcentage approximatif de prise tumorale, et les doses efficaces de drogues à administrer. Nous allons également utiliser un test statistique non-paramétrique pour pouvoir réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de données exploitables statistiquement. De plus, plusieurs mesures seront prises afin d'être en conformité avec les exigences de raffinement. Ainsi, les animaux seront mis dans des cages sur portoirs ventilés (5 animaux/cage), enrichies par des petits morceaux de papiers et des maisons rouges à double entrée. La nourriture et la boisson *ad libitum* et une évaluation quotidienne de l'état général des souris (stress, souffrance) sera effectuée dès le début des traitements.

826- La douleur est un problème de santé publique très important autant dans la vie quotidienne que lors d'accidents ou suite à une opération chirurgicale. Le système nerveux est le système physiologique qui permet de ressentir la douleur. Celui-ci utilise des chemins moléculaires afin d'envoyer le signal douloureux à l'organisme. Certains de ces chemins moléculaires ne sont pas encore connus.

Nous avons identifié un couple de molécules (ligand-récepteur = FL-FLT3) qui semble avoir un rôle dans la perception de la douleur et nous souhaitons préciser la manière dont ce couple intervient dans les mécanismes de la douleur. Pour réaliser ceci nous allons utiliser des modèles de douleur bien connus chez la souris et évaluer l'impact du couple FL/FLT3 sur cette douleur soit en injectant le FL lui-même soit en injectant un inhibiteur du récepteur FLT3. Différents types de douleur seront testés, comme les douleurs inflammatoires et les douleurs neuropathiques. Les inhibiteurs du récepteur pourraient devenir à termes des candidats médicaments antalgiques ou analgésiques.

Des lignées de souris KO seront également utilisées (une pour le gène FLT3 et une pour le gène FL) afin d'identifier les modes d'action de ce couple de molécules dans la perception de la douleur.

Le nombre de souris (2376) utilisées sera réduit au minimum afin de limiter l'utilisation d'animaux vivants mais de manière à avoir des effectifs compatibles avec les tests statistiques utilisés. Cet effectif a été déterminé en tenant compte de la règle des 3R :

- remplacement car des expérimentations sont réalisées en amont sur des cultures cellulaires afin de limiter l'utilisation d'animaux par exemple en sélectionnant uniquement les molécules pertinentes *in vitro* avant de les tester sur animaux.
- Réduction car le nombre d'animaux par lot a été calculé grâce à un logiciel dédié afin d'utiliser le minimum d'animaux tout en pouvant mettre en évidence les éventuels effets.
- Raffinement car les procédures d'hébergement sont adaptées

827- Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Il survient en majorité lors de maladies du foie préexistantes. La première incidence étant la cirrhose suivie par les infections virales (virus de l'hépatite B, virus de l'hépatite C), l'intoxication alcoolique ou encore la stéatohépatite non alcoolique (NASH). Le traitement du CHC est indispensable sous peine d'une évolution toujours fatale. Les traitements curatifs actuels sont la chirurgie avec résection de la tumeur et/ou la transplantation hépatique. Cependant, lorsque le diagnostic est tardif et la maladie découverte à un stade avancé, ces traitements ne sont plus envisageables. Depuis 2007, de nouvelles molécules ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique contre le CHC. Ce sont des traitements ciblés : ils agissent sur des récepteurs tumoraux spécifiques du cancer pour empêcher notamment le développement de micro-vaisseaux qui alimentent le cancer et permettent son développement. Parmi ces nouveaux médicaments, appelés antiangiogéniques,

seul le sorafenib est actuellement approuvé dans le traitement du CHC. L'évaluation de nouvelles molécules reste donc un enjeu important. Bien que les études utilisant le sorafenib aient montré des résultats incontestablement positifs dans le traitement du CHC avancé, le bénéfice en termes de survie reste relativement modeste. Plusieurs pistes sont actuellement explorées afin d'améliorer encore l'efficacité de cette molécule, comme la combinaison avec d'autres molécules ou encore la compréhension des mécanismes qui empêchent le médicament de continuer à être efficace. Après une période d'administration variable, la tumeur devient en effet résistante au médicament.

Les essais précliniques sur les animaux sont utilisés en premier abord pour des raisons éthiques avant l'extrapolation de leurs résultats à l'homme. Ce projet propose d'utiliser la souris immunodéprimée nous permettant de greffer des cellules humaines de CHC sans risque de rejet. Ce modèle consiste donc à établir des tumeurs de CHC chez l'animal pour l'étude de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est grâce à une première procédure que nous pourrions déterminer le nombre d'animaux à utiliser dans les différents groupes de traitement. Cette étape du projet nous permettra de réduire les effectifs à leur minimum, puisque les résultats seront validés par des tests statistiques.

Une fois le protocole validé et le nombre de souris par groupe fixé, nous utiliserons ce modèle pour tester des nouvelles molécules à activité anti-tumorale en combinaison au sorafenib et/ou après échec du traitement au sorafenib. Pour l'ensemble du projet nous aurons potentiellement besoin de 600 animaux selon les résultats obtenus et le nombre de molécules à tester (1 molécule par an en moyenne). Ce projet pourrait alors optimiser la thérapie anticancéreuse des patients atteints de CHC avancé.

828- Les lymphocytes MAIT représentent une population de lymphocytes dont la spécificité est très conservée entre espèces. Les lymphocytes MAIT reconnaissent un composé présent dans la plupart des bactéries et levures. Leur expansion en périphérie est dépendante de la flore intestinale car ces cellules sont quasiment absentes des souris sans germe. Les cellules MAIT sont très abondantes chez l'homme mais très rares chez la souris. L'origine de cette différence n'est pas connue et pourrait être l'environnement microbien dans lequel sont élevées les souris de laboratoire. Afin de tester cette hypothèse, des souris sans molécules du CMH de classe I et II, nées et élevées sans germe, seront reconstituées avec une flore microbienne de souris conventionnelle ou avec une flore humaine, ou bien laissées sans germe. Les souris seront ensuite mises en accouplement (12 couples, soit 24 souris). Les petits des trois groupes (18 souriceaux) seront sacrifiés à l'âge de 8-10 semaines et les cellules MAIT seront quantifiées dans l'intestin et les organes lymphoïdes. Ceci permettra de déterminer si l'absence de MAIT chez la souris de laboratoire est liée ou non au type de flore microbienne colonisant l'intestin. Si c'est le cas, la flore humaine devrait permettre une augmentation du nombre de lymphocytes MAIT plus forte que celle induite par une flore de souris. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail qui nécessite l'analyse de tissus lymphoïdes en réponse à des flores digestives différentes. Le nombre de souris à mettre en accouplement (24) a été calculé pour obtenir 18 souriceaux nés au même moment. Le nombre de souriceaux dont les tissus seront analysés (18) a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à des analyses statistiques valides, condition nécessaire pour une interprétation biologique des résultats.

829- La maladie de Parkinson est, de par sa prévalence de 1,5 pour mille, la plus fréquente des pathologies neurodégénératives, après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 100 000 personnes en France.

La maladie de Parkinson se caractérise par un syndrome moteur défini par une akinésie associée à un tremblement de repos, une rigidité musculaire et une instabilité posturale.

- L'akinésie se caractérise par un défaut d'initiation et d'exécution des mouvements volontaires, et s'accompagne souvent d'une bradykinésie, traduisant une lenteur d'exécution du mouvement.

- La rigidité musculaire parkinsonienne est une forme particulière d'hypertonie musculaire, se traduisant par une résistance aux mouvements passifs.

- Le tremblement de repos correspond à un mouvement lent (4 à 6 hertz) et involontaire qui débute généralement de manière unilatérale et prédomine aux extrémités des membres.

- L'instabilité posturale est principalement la conséquence de l'hypertonie qui fragilise l'équilibre, la station verticale ainsi que le développement dynamique de la marche et entraîne de nombreuses chutes chez les parkinsoniens.

La principale caractéristique neuropathologique de la maladie de Parkinson est la dégénérescence progressive et massive des neurones dopaminergiques de la Substance noire *pars compacta* (SNc). Les événements qui sous-tendent cette dégénérescence restent mal connus. Ceci rend le diagnostic de la maladie de Parkinson difficile, d'autant que l'apparition des symptômes ne se produit qu'après une perte neuronale importante. À l'heure actuelle, le traitement de la maladie est donc essentiellement symptomatique. Apparue à la fin des années 60, la stratégie thérapeutique de référence vise à compenser le déficit dopaminergique par l'administration du précurseur de la dopamine, la L-DOPA. Bien que différents agonistes dopaminergiques directs soient disponibles, la DOPA-thérapie demeure la plus efficace. Mais si ce traitement améliore les symptômes moteurs dans un premier temps, son efficacité s'atténue à long terme et entraîne l'apparition d'effets secondaires très invalidants pour le patient, caractérisés notamment par des fluctuations motrices et des mouvements anormaux involontaires appelés dyskinésies. Le handicap sévère résultant des effets indésirables du traitement à la L-DOPA a conduit à la recherche d'autres stratégies thérapeutiques. Sur la base de nombreux travaux, il est aujourd'hui crucial de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de pouvoir tester leur efficacité sur des modèles précliniques prédictifs. Ainsi le but de ce projet est de pouvoir proposer 2 modèles précliniques de la maladie de

Parkinson chez le rat dans le but de tester l'efficacité antiparkinsonienne d'un candidat médicament. Le modèle de catalepsie induit par l'administration d'haloperidol est utilisé comme un test de screening et est largement utilisé pour tester les effets antiparkinsoniens de composés pharmacologiques. La catalepsie mesurée dans ce test s'apparente au trouble de l'initiation motrice rencontré chez le patient parkinsonien. Le deuxième modèle proposé est le modèle de lésion unilatérale dopaminergique totale. Ce modèle expérimental analogue de la maladie de Parkinson mime les déficits moteurs observés chez les patients Parkinsoniens à des stades avancés de la maladie. Ce modèle Parkinsonien chez le rat est obtenu grâce à l'injection de la neurotoxine 6-OHDA qui entraîne la mort sélective des neurones dopaminergiques. Deux semaines après la lésion, des tests comportementaux d'akinésie (tests d'initiation, du stepping et du cylindre) sont utilisés pour évaluer l'efficacité antiparkinsonienne des traitements testés. L'efficacité des candidats médicaments sera comparée à la L-DOPA représentant le traitement de référence. Dans le cas où le traitement est administré de façon préventive (avant la lésion dopaminergique), l'effet neuroprotecteur pourra être évalué en comptant le nombre de neurones dopaminergiques survivant après lésion dans les différents groupes expérimentaux. Pour cela, des études d'immunohistochimie à posteriori pourront être réalisées en marquant spécifiquement les neurones dopaminergiques (neurones tyrosine hydroxylase (TH) positifs). Ainsi le modèle de lésion dopaminergique par la 6-OHDA apparaît comme un modèle plus élaboré, mimant la dégénérescence des neurones dopaminergiques observée dans la maladie de Parkinson ou l'efficacité des candidats médicaments peut être évaluée à la fois sur les symptômes moteurs Parkinsoniens mais également sur l'aspect de neuroprotection dans le cas où le traitement est préventif. Ces 2 modèles sont donc complémentaires ; le premier étant considéré comme un modèle de screening quand le second permet, de part la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques, une évaluation plus fine de l'efficacité potentielle de nouveaux candidats médicaments.

Pour tester l'efficacité d'un candidat médicament sur une série expérimentale, incluant un groupe contrôle négatif, un groupe contrôle positif, 3 groupes tests (1 composé candidat testé à 3 doses), et un groupe incluant un composé de référence, le nombre total d'animaux pour une série expérimentale est de : 60 animaux, pour un total de 25 séries sur 5 ans, soit 1500 animaux.

830- Notre étude a pour but de comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale et d'évaluer l'impact d'une consommation chronique d'alcool en nous appuyant sur le modèle de l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (ACM) réalisée sur le rat. Ce modèle est proche de l'accident vasculaire ischémique le plus fréquemment observé en clinique humaine. Au cours de notre étude, nous allons pouvoir évaluer les effets post-ischémiques (de 24h à 7j) d'une consommation chronique d'alcool (10% et 35% pendant 4 semaines avant la survenue de l'AVC) en réalisant soit des analyses histologiques, biochimiques et/ou électrophysiologiques après sacrifice des animaux, soit des suivis de lésion sur des mêmes animaux par imagerie par résonance magnétique (IRM). En plus de ces analyses, nous pourrions évaluer les déficits fonctionnels induits par l'ischémie-reperfusion par des tests comportementaux moteurs, sensori-moteurs et mnésiques. L'obtention des résultats issus de l'utilisation de ce modèle expérimental animal tant sur la physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral que sur l'effet d'agents délétères tels que l'alcool, représente une étape indispensable à la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques et à la mise en place d'études cliniques.

831- L'accident vasculaire cérébral est un problème de Santé Publique et représente la première cause de handicap, la deuxième cause de démence et la troisième cause de décès dans les pays industrialisés. A l'heure actuelle, peu de traitements sont disponibles et il est indispensable de poursuivre les études au niveau préclinique afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le modèle utilisé ici est le modèle de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant une heure afin d'induire une ischémie focale au niveau cortical et striatal dans l'hémisphère droit. Ce modèle est proche de l'accident vasculaire ischémique le plus fréquemment observé en clinique humaine. Les conséquences de l'accident vasculaire cérébral sont évaluées à court terme (de 24 heures à 1 mois) ou à long terme (jusqu'à 12 mois) en fonction du protocole. L'évaluation des lésions cérébrales par imagerie par résonance magnétique permet de suivre leur évolution au fil du temps sans avoir à sacrifier les animaux. En parallèle, l'impact sur la fonctionnalité vasculaire cérébrale, les handicaps moteurs et mnésiques sont évalués. L'ensemble de ces techniques permet d'avoir une approche globale de la pathologie et d'apprécier l'impact de différents agents neuroprotecteurs.

832- La mention 'Agriculture Biologique' (AB) sur un produit garantit une manière de produire, mais la question est souvent posée de la qualité alimentaire des produits AB et l'exigence d'une maîtrise de résultats doit probablement être anticipée. Il faut rappeler que l'élevage biologique promeut le pâturage, ce qui est favorable à la valeur santé de la viande pour l'homme.

Cependant, les recherches récentes montrent un risque accru de défauts de qualités sensorielles de la viande d'agneau produite dans les systèmes biologiques : risque accru de défauts de flaveur/odeur de la viande probablement lié à une production accrue de scatole dans le rumen, et risque accru de défauts de fermeté du tissu adipeux de couverture en lien avec un rapport acides gras polyinsaturés/acides gras saturés plus élevé. Ces défauts sont probablement en lien avec une proportion accrue de trèfle blanc dans les prairies biologiques, du fait de l'interdiction de la fertilisation minérale.

Cette expérimentation a pour but i) de comparer les différents critères de qualité de la viande et de la carcasse d'agneaux d'herbe, lorsqu'ils sont produits en élevage Bio ou en élevage conventionnel, à deux niveaux de complémentation en céréales et ii) d'étudier dans quelle mesure l'apport de concentré au pâturage modifie la concentration des marqueurs de l'alimentation à l'herbe dans le produit viande.

Deux groupes de 28 agneaux mâles de race Limousine seront engraisés à l'herbe entre le sevrage (à environ 3 mois) et l'abattage (à 5 mois en moyenne, mais avec une certaine variabilité liée à la variabilité naturelle des performances de croissance des agneaux d'herbe). Un groupe d'agneau provient d'un élevage biologique et sera engraisé sur une prairie biologique. L'autre groupe provient d'un élevage conventionnel et sera engraisé sur une prairie conventionnelle recevant 100 unités d'azote minéral/ha/an. La moitié des agneaux de chaque groupe recevra une complémentation en orge (300 g/j/agneau) après avoir été triée des agneaux non complémentés.

L'apport de céréales devrait permettre d'améliorer les qualités sensorielles de la viande en i) réduisant la formation de scatole dans le rumen, ii) réduisant l'âge à l'abattage des agneaux, facteur important de la flaveur/odeur, de la tendreté et de la couleur de la viande et iii) limitant le risque de PH ultime élevé de la viande, facteur important de la couleur et de la conservation de la viande. Par ailleurs, l'apport de concentré au pâturage devrait réduire la concentration des marqueurs de l'herbe dans le plasma et dans la viande à travers i) une diminution de l'ingestion d'herbe et ii) un état d'engraissement plus important.

833- L'acétonémie est une maladie métabolique dont la fréquence ne fait que s'accroître. Elle est caractérisée par une déviation du métabolisme survenant lors d'un déficit énergétique en début de lactation et qui aboutit à l'accumulation de corps cétoniques (acétone, β -hydroxybutyrate (BHB) et acétoacétate) dans le sang. Elle peut être clinique ou subclinique. Son diagnostic est difficile en raison de la non-spécificité des symptômes. De ce fait, la fréquence de l'acétonémie subclinique, évaluée entre 7 et 34% selon les sources, est sans doute sous-estimée.

Cette maladie induit aussi une modification de la composition du lait ainsi qu'un amaigrissement des animaux et une chute de leur production, rémanents sur l'ensemble de la lactation. Dans ce contexte, la recherche d'indicateurs de l'acétonémie est un enjeu majeur pour apporter à l'éleveur un diagnostic pertinent sur la situation sanitaire des vaches laitières de son troupeau.

A l'heure actuelle, le diagnostic de l'acétonémie repose sur le dosage du BHB sanguin. La faible praticité de ce test (prise de sang et analyse en laboratoire pour chaque animal) le rend peu adapté au diagnostic individuel en routine. Les autres indicateurs d'acétonémie utilisés (glucose et acides gras non-estérifiés plasmatiques, rapport TB/TP (taux butyreux/taux protéique),...) ne sont pas spécifiques de l'acétonémie.

Le principal objectif de la présente étude est d'établir un indicateur fiable de l'acétonémie à partir de l'exploitation des signatures spectrales (spectres moyen infrarouge) des laits, des données de production laitière, de taux butyreux et protéique, de la composition des acides gras du lait, du β OH-butyrate du lait, et des indicateurs plasmatiques (β OH-butyrate sanguin, acides gras non-estérifiés, glucose, insuline, leptine et IGF1). Cette étude utilisera 41 vaches laitières (20 Holstein et 21 Montbéliardes). Elles seront suivies à 4 semaines avant vêlage et jusqu'à 12 semaines après vêlage, avec des prélèvements hebdomadaires de sang et de lait.

834- La colonisation de matériel médical ou de tissus humains sous forme de communautés bactériennes pathogènes (biofilms) conduit au développement d'infections chroniques difficiles à éradiquer et constitue un problème majeur de santé publique. L'utilisation de molécules antibiotiques avec ou sans adjuvants, ou de composés réduisant l'adhésion des bactéries peuvent constituer des moyens de lutter contre les infections à biofilms.

Nous avons développé avec succès des molécules adjuvantes qui augmentent l'efficacité des antibiotiques et des composés antiadhésifs qui réduisent la colonisation de bactéries invasives et contribuant au biofilms sur des dispositifs médicaux de type cathéter. Ces différentes molécules ont aussi un potentiel curatif ou prophylactique pour interférer avec la colonisation par des bactéries entéro-invasives responsables de diarrhées aiguës, de colites ou d'infections extra-intestinale. Il est nécessaire de tester, in vivo, les propriétés curatives ou prophylactiques des molécules que nous avons développées et testées in vitro. Pour cela, la mise en place d'un modèle animal est nécessaire, le modèle in vitro ne permettant pas d'appréhender toute la complexité des interactions entre le biofilm et le tissu vivant sur lequel il se développe.

Nous allons donc développer, chez la souris, un modèle de colonisation intestinale par des bactéries entéro-invasives d'origine humaine comme les Escherichia coli ou les Vibrio cholerae et des bactéries comme Klebsiella pneumoniae ou les Escherichia coli uro-pathogènes qui ont atteint des tissus distants de l'intestin. Dans un deuxième temps ce modèle permettra d'évaluer la capacité de traitements curatifs ou prophylactiques pour tenter de limiter ou de réduire la colonisation intestinale par ces bactéries. Afin de répondre à ces questions en utilisant le nombre adéquat d'animaux, calculé par des méthodes statistiques, ce projet demandera l'utilisation approximative de 2500 animaux sur 5 ans. Toutes les explorations seront mises en œuvre en prenant soin d'éviter le mal être des souris ou de le limiter (en particulier au recours systématique à l'anesthésie à chaque fois que possible) en retenant les points limites les plus précoces compatibles avec l'obtention de données biologiquement pertinentes.

835- Les bactéries pathogènes *Escherichia coli* adhérentes et invasives (Adherent Invasive *Escherichia coli*, AIEC) ont été isolées dans l'intestin de patients atteints de maladie de Crohn mais sont absentes chez les sujets sains. La maladie de Crohn est caractérisée par une dérégulation de la réponse immunitaire au sein de la muqueuse intestinale conduisant à l'installation d'une inflammation chronique. Ce projet vise à étudier comment les bactéries AIEC pourraient contribuer à initier et/ou à entretenir d'une réponse immunitaire intestinale anormale similaire à celle observée dans la maladie de Crohn. A long terme, la compréhension des mécanismes de pathogénicité des AIEC à l'échelle moléculaire et cellulaire permettra d'identifier de nouvelles pistes de diagnostic et/ou thérapeutiques pour ces patients.

L'objectif expérimental principal est d'étudier, en réponse à l'infection par les bactéries AIEC, le recrutement, l'activation et la fonctionnalité des différentes sous-populations de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale. Certaines sous-populations sont connues pour être anormalement activées chez les patients atteints de la maladie de Crohn, notamment les lymphocytes Th1 et Th17, d'autres sont connues au contraire pour réguler les réponses immunitaires comme les Treg : ces populations seront particulièrement étudiées. Les expériences seront réalisées sur des souris infectées par voie orale avec les bactéries AIEC ou avec des souches bactériennes non-pathogènes, à titre de contrôle. Il est connu que les patients développant la maladie de Crohn sont souvent porteurs d'une susceptibilité à cette maladie, par exemple une mutation sur le gène *Nod2* ou encore la surexpression de la molécule CEACAM6 au niveau entérocytaire, permettant aux bactéries AIEC d'adhérer et d'envahir la muqueuse intestinale. L'influence de ces facteurs de l'hôte sera étudiée grâce à deux modèles de souris :

- une lignée de souris transgéniques exprimant le récepteur humain CEACAM6,
- une lignée de souris invalidées pour le gène *Nod2*, ce gène étant le plus fréquemment muté chez les patients.

Afin de reproduire le plus fidèlement possible le contexte inflammatoire dans lequel la maladie de Crohn se développe, les souris pourront être nourries avec un régime alimentaire spécial riche en graisses et en sucres, mimant le régime alimentaire dit « occidental » connu pour favoriser la maladie.

L'expérimentation animale est indispensable pour ce projet : en effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de rendre compte de la complexité d'une réponse immunitaire.

Cette exploration in vivo permettra de mettre en évidence les types cellulaires impliqués afin poursuivre par la suite les études ex vivo ou in vitro dans la mesure du possible.

Les expériences proposées induisent un niveau de stress et de douleur modéré. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire et chaque expérience sera exploitée au maximum (étude parallèle de différents organes) pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Le nombre maximal d'animaux utilisés est estimé à 720.

836- La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex: foie, rein, poumon, etc. chez l'animal).

Le toxicologue s'intéresse aux effets directs et indirects, immédiats et différés, à fortes et faibles doses, en exposition aiguë, sub-chronique ou chronique, d'une substance ou d'un mélange (effet "cocktail") sur les conditions externes et leurs effets délétères sur les communautés et organismes vivants, sur les organes, tissus, cellules ou organites et sur les gènes et la reproduction.

La toxicité orale aiguë est l'effet néfaste qui se produit dans un court laps de temps et qui résulte de l'administration par voie orale d'une ou plusieurs doses d'une substance au cours d'une période de 24 heures. La dose est la quantité administrée de la substance à tester. Elle s'exprime en poids de substance testée par unité. Une seule ou plusieurs doses sont utilisées et on analyse les signes d'intoxication et la mortalité (dose létale ou DL). Une étude de toxicité aiguë aboutit classiquement à la détermination de la DL50. La DL50 orale est la valeur statistiquement dérivée d'une dose unique de substance dont l'administration par voie orale peut provoquer la mort de 50 % des animaux d'expérience. C'est une technique exploratoire, permettant de "trier" les produits les plus toxiques et l'on considère qu'au-dessus de 2 g/kg de poids corporel (5 g/kg de poids corporel dans certains cas spécifiques), la DL50 n'a plus de signification.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets d'une forte exposition. Cette notion ne présente aucun intérêt dans l'évaluation du risque consommateur qui est de n'avoir aucun effet indésirable. De plus, une DL50 élevée n'est en aucun cas prédictive pour un éventuel effet cancérigène, ni sur les risques d'effets toxiques dus à l'absorption de faible quantité durant une vie entière. La signification de la DL50 est donc très limitée et les industriels ne peuvent en aucun cas se contenter d'une étude de toxicité aiguë lors du dépôt d'un dossier de demande d'autorisation.

L'objet de cette étude, répondant aux exigences de la ligne directrice OCDE n° 423 est donc d'étudier la toxicité éventuelle d'un composé naturel, GLYBA, administré par voie orale en traitement unique à la dose limite de départ de 2000 mg/kg, selon l'annexe 2d de cette ligne directrice OCDE n° 423, chez des rats femelles uniquement, celles-ci étant considérées comme étant plus sensibles que les mâles aux effets toxiques potentiels de substances. Ces études de toxicité aiguë ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives. Ainsi 6 à 24 rats femelles Wistar au maximum seront utilisés pour ce projet, 6 rats seulement étant commandés dans un premier temps afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés mais tout en permettant l'analyse correcte des résultats (raffinement) selon la ligne directrice OCDE n° 423. En fonction des résultats, d'autres lots de 3 à 6 rats femelles maximum seront achetés si nécessaire pour compléter l'étude en testant une ou plusieurs doses inférieures à 2000 mg/kg afin de déterminer la dose

non toxique du composé naturel GLYBA. Après traitement, les animaux sont observés et pesés régulièrement pendant 14 jours jusqu'à leur « mise à mort ».

837- Le projet présenté s'inscrit dans le cadre du développement d'un complément alimentaire hypoglycémiant innovant à partir d'un extrait enrichi en peptides bioactifs, associé à 2 extraits végétaux standardisés en polyphénols. Les peptides identifiés, largement présents dans les protéines de coproduits marins, ont en effet montré une inhibition forte et novatrice d'une enzyme cible dans la prévention et le traitement du diabète de type 2. L'adjonction des extraits standardisés en polyphénols permettra d'obtenir un complément alimentaire ciblant différentes cibles stratégiques dans la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Ce projet vise donc à objectiver les effets individuels des molécules identifiées (peptides et polyphénols) afin de développer de manière optimale les différents vecteurs (hydrolysats de protéines pour les peptides et extraits végétaux) et in fine, leur combinaison. Il inclut ainsi 4 étapes au cours desquelles 25 groupes de 20 souris diabétiques (soit un nombre total de 500 souris db/db) seront utilisées pour les travaux de recherche.

838- Face à l'explosion de l'obésité et des maladies métaboliques associées, il est essentiel de cerner l'importance de la nutrition sur les mécanismes de prise de poids et d'en comprendre les conséquences sur le métabolisme. L'augmentation de la masse grasse lors du surpoids et de l'obésité favorise l'apparition de pathologies métaboliques comme l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Il est aujourd'hui reconnu que l'équilibre entre les acides gras selon leur nature chimique, plus que leur quantité absolue, est impliqué dans la physiopathologie des maladies métaboliques chroniques (« Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras » AFSSA, saisine n° 2006-SA-0359, mars 2010). En moyenne, malgré les différences régionales, les régimes alimentaires européens sont caractérisés par des apports élevés en acides gras saturés (AGS) et en acides gras polyinsaturés (AGPI) n-6, et par de faibles apports en acides gras monoinsaturés (AGMI) et en AGPI n-3. Peu d'études ont été menées aujourd'hui pour explorer l'importance des AGPI n-3 en nutrition périnatale et leur « empreinte nutritionnelle » dans la prévention de l'obésité et du syndrome métabolique des nouvelles générations est inconnue.

L'objectif principal du projet est d'explorer l'intérêt des AGPI n-3 pour la prévention de l'obésité et du syndrome métabolique sur 3 générations de souris. Nous avons pour cela besoin de suivre deux familles de souris, l'une nourrie avec un régime standard (A03), l'autre avec un régime A03 enrichi à hauteur de 1% du poids en AGPI n-3 (soit 2% de l'apport énergétique total, 3). Les femelles d'une génération Fi sont maintenues sous le même régime de leur conception jusqu'à leur mise en reproduction (vers 3 mois), puis durant la gestation et l'allaitement de leurs petits Fi+1. Les mâles d'une génération Fi sont maintenus sous le même régime de leur conception jusqu'à la reproduction (vers 3 mois), puis reçoivent aléatoirement et à raison de la moitié des animaux par famille, soit un régime maigre contrôle (type RD 12450H, CTRL), soit un régime obésogène riche en lipides et en sucrose (type RD 12451, HFHS pour high fat high sucrose), afin d'explorer l'évolution du poids, de la composition corporelle et de la sensibilité à l'insuline. Nous devrions avoir au total 270 à 300 animaux sur l'ensemble des générations.

839- L'implantation cochléaire dans les surdités profondes bilatérales s'est imposée comme une référence en matière de réhabilitation auditive. Néanmoins, l'implantation cochléaire crée une réponse inflammatoire aiguë et chronique au niveau des cellules ciliées externes et internes et au niveau des axones neuronaux du nerf auditif dont les mécanismes sont bien décrits actuellement. Afin de limiter cette réaction inflammatoire et de tenter de conserver l'audition résiduelle post-implantation, l'injection systémique et locale de plusieurs agents pharmacologiques et de facteurs de croissance neuronaux ont été étudiés chez le cobaye. Toujours dans l'objectif de diminuer l'inflammation locale cochléaire et de favoriser une conservation de l'audition, l'implantation des électrodes directement dans le nerf modiolaire a été étudiée ; les résultats ont montré de façon significative une meilleure sélectivité des fréquences associée à une augmentation des stimulations spatiales tout en réduisant l'inflammation locale sans détruire le nerf modiolaire.

Devant les données scientifiques actuelles, il serait donc intéressant d'étudier chez le rat une technique chirurgicale d'implantation cochléaire moins invasive, moins traumatique pour les cellules cochléaires, qui pourra être objectivée par l'étude de coupes histologiques post-implantation, tout en essayant de conserver l'audition qui pourra être mise en évidence par la réalisation de Potentiels évoqués auditifs (PEA).

L'objectif principal de notre étude est la mise au point technique d'implantation cochléaire chez le rat par voie trans-modiolaire.

Les objectifs secondaires sont la tentative de conservation de l'audition post-implantation par mesure objective de l'audition par des PEA en post-opératoire immédiat et à distance et l'étude des lésions cochléaires secondaires à l'implantation par une étude histologique.

Méthodes: Dix rats seront utilisés dans notre étude. Les animaux seront opérés sous anesthésie générale par une voie rétro-auriculaire afin de mettre en place un porte-électrode en silicone au niveau du nerf cochléaire. Une couverture antibiotique par voie systémique sera mise en place en post-opératoire. Durant l'intervention, une injection de Gentamicine sera réalisée dans l'oreille contro-latérale afin de créer une apoptose des cellules cochléaires et d'éviter les faux positifs lors des PEA. Des PEA seront réalisés en pré opératoire, post-opératoire immédiat (J0 et J2) et à distance (J15

et J30) afin d'objectiver la conservation auditive. Les animaux seront sacrifiés à J30 et les cochlées seront prélevées pour une étude histologique et confirmer l'implantation dans le nerf modiolaire.

Le respect des 3R (remplacement, réduction, raffinement) sera appliqué aux rats étudiés dans notre étude. Afin de limiter la morbi-mortalité de cette nouvelle technique, il est nécessaire d'étudier sa faisabilité, ses effets à court et long terme sur les cellules ciliées internes et externes et les terminaisons nerveuses ainsi que ses conséquences sur l'audition résiduelle. Il est donc indispensable de l'appliquer à une espèce vivante pour pouvoir l'étudier de façon la plus complète. Le cadre et le mode de vie des animaux ne seront pas modifiés durant l'expérimentation. Tout le matériel nécessaire à l'implantation (microscopique, boîte avec le matériel chirurgical...) et à la réalisation des Potentiels Evoqués Auditifs sera importée dans l'animalerie après une désinfection rigoureuse. Les animaux seront systématiquement remis dans leur cage après les tests auditifs. La manipulation des rats sera douce et non traumatique. Afin de pouvoir réaliser des tests statistiques, le nombre minimum d'individus à inclure doit être de trois. Or, on ne peut éliminer l'apparition de facteurs intercurrents qui obligera à exclure des individus de l'étude (décès, maladie...). Pour pouvoir mener l'étude de façon optimale, et pour pouvoir apporter des conclusions admissibles dans la communauté scientifique avec des résultats significatifs et avec un fort niveau de preuve, un nombre de dix rats est le nombre minimum à inclure.

Résultats attendus :

Audition : L'audition sera dégradée après la réalisation de l'implantation cochléaire ; la perte auditive sera plus importante à distance de l'implantation (PEA à J15 et J30) qu'en post-opératoire immédiat.

Histologies : L'étude des coupes histologiques mettra en évidence une réaction inflammatoire, une fibrose ainsi que des lésions nerveuses partielles qu'il est souhaitable de minimaliser par la voie d'abord trans modiolaire.

Perspectives : L'apport et la connaissance d'une nouvelle technique chirurgicale moins traumatique pour l'implantation cochléaire chez le rat pourra être élargie par la suite à l'implantation cochléaire humaine. Celle-ci pourra permettre de conserver la réserve cochléaire chez l'humain grâce à une diminution de la réponse inflammatoire, de la fibrose et des lésions nerveuses. Par la suite, d'autres études pourront permettre de mettre en évidence l'action de plusieurs molécules (Dexaméthasone ...) à visée anti-inflammatoires sur les cellules cochléaires et d'améliorer l'audition résiduelle. L'étude sera poursuivie par la mise en place d'un porte -électrode chez le rat par voie trans-modiolaire et enregistrement des PEA.

840- L'anxiété est un trouble du comportement fréquent chez le chat vivant en milieu clos (chat d'appartement) puisque 54% de ces animaux de compagnie présentent un comportement de type anxieux. Chez le chat, comme chez l'homme, les molécules anxiolytiques sont utilisées pour traiter ces symptômes. Toutefois, ces médications présentent des problèmes de dépendance, de tolérance et de sevrage. De plus, ces molécules induisent une désinhibition comportementale associée à des comportements agressifs.

La recherche de nouveaux traitements anxiolytiques présentant moins d'effets secondaires est donc nécessaire. C'est dans ce cadre que se situe ce travail.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les propriétés anxiolytiques d'un nouveau traitement chez le rat utilisé comme modèle du chat. Pour cela, les 52 rats mâles Wistar d'un poids de 250 g seront évalués sur le plan comportemental suite à une administration aiguë du traitement avec le produit X. Une dose réponse sera réalisée afin de déterminer la dose la plus d'efficace.

Les résultats de cette étude fourniront des données utiles à la mise en place d'une étude clinique des propriétés de ce produit chez le chat.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de technique in vitro permettant d'évaluer les effets antistress d'un traitement. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant une interprétation scientifique des résultats. Le test utilisé étant stressant et anxiogène pour les animaux, sa durée sera limitée au minimum nécessaire en accord avec les pratiques décrites dans la littérature scientifique.

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

Or, comme le souligne la réglementation (ex : directive 2007/47/CE), il est obligatoire de prouver l'efficacité de ces produits avant de proposer un produit sur le marché. Notre établissement est fortement engagé dans le développement de méthodes alternatives in vitro : tests de cytotoxicité, test d'irritation in vitro, test de sensibilisation in vitro, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent pas de tester intégralement l'efficacité des produits de santé, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des

études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 1500 lapins, 1000 rats, 200 ovins, 100 caprins et 200 porcins.

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

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

842- Les muscles squelettiques assurent de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Aussi, leurs altérations peuvent avoir des répercussions sur la fonction motrice et la qualité de vie des patients. Avec l'âge, une diminution de la force et de la masse musculaire est observée, on parle de sarcopénie, avec des conséquences sur la mobilité et l'autonomie des personnes âgées. L'industrie du secteur agroalimentaire ou pharmacologique s'oriente vers le développement de produits qui visent à inverser ces altérations liées à l'âge. Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de nouveaux produits, alimentaire ou pharmacologique, pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, nous envisageons de tester 5 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des rats Wistar âgés seront traités pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation, et associé au non à un entraînement des animaux. Les animaux seront répartis en maximum 5 groupes, selon le nombre de molécules ou doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 30 animaux par groupe.

Un ensemble de paramètres seront évalués pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront évalués. La force d'agrippement (Grip test), les capacités de déplacements horizontaux et verticaux (Actimètre), les caractéristiques de marche (Empreinte) ainsi que l'anxiété des animaux (Croix surélevé et Préférence de place) seront également analysés avant, au cours et à la fin du traitement, et ce après une période de familiarisation des animaux avec les différents systèmes utilisés. Cette répétition de mesures non invasives permettra ainsi de suivre de régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur chaque animal. Cette approche in vivo sera complétée par des techniques in vitro d'analyse de la fonction musculaire en vue d'identifier les cibles d'action des composés.

Pour cela, en fin de traitement les animaux seront euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles seront analysés.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau préclinique les effets musculaires de composés à destination de l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique. Les études conduites sur des animaux âgés nécessitent de tenir compte de leur taux de mortalité. Ainsi, pour avoir un effectif final de 15 animaux par groupe, un effectif initial de 30 animaux par groupe est nécessaire. Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales. Les méthodes utilisées sont validées et majoritairement non invasives, des périodes d'acclimatation et d'habituation sont systématiquement envisagées. Lors de la réalisation des procédures expérimentales, un renforcement positif par récompense est mis en place pour limiter le stress des animaux. Au final, sur 5 ans, 750 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

843- Le projet présenté vise en particulier à objectiver les effets de la complémentation en *Chrysanthellum americanum* associé ou non à d'autres extraits végétaux sur la cholestérolémie chez des souris db/db. Les animaux seront rendus davantage hypercholestérolémiques par un régime riche en graisses déjà décrit dans la littérature scientifique. La complémentation en extraits végétaux sera réalisée sur une durée de 12 semaines et les produits à tester seront incorporés dans la nourriture des animaux.

Le projet inclut 6 groupes de 14 souris diabétiques (soit un nombre total de 84 souris db/db) qui seront utilisées pour les travaux de recherche résiduelle. L'étude sera poursuivie par la mise en place d'un porte -électrode chez le rat par voie trans-modiolaire et enregistrement des PEA.

844- La maladie de Parkinson est caractérisée par une perte progressive en neurones dopaminergiques. Cette neurodégénérescence touche particulièrement les cellules de la substance noire (SNc) et, dans une moindre mesure, les cellules de l'aire tegmentale ventrale (VTA). La voie nigrostriatale (SNc-striatum) est notamment impliquée dans le control moteur, son altération sera donc responsable de détériorations motrices de type bradykinésie, rigidité ou encore tremblements de repos. Les thérapies de remplacement dopaminergiques (DRT) restent, à l'heure actuelle, l'approche

thérapeutique privilégiée. Dans ce type de traitement, la L-Dopa, molécule de référence, est largement utilisée et est administrée de façon chronique. Cependant, outre la diminution progressive du nombre de neurones dopaminergiques, les administrations répétées de L Dopa vont contribuer à l'altération des voies mises en causes dans la maladie de Parkinson et donner lieu à une stimulation pulsatile des récepteurs dopaminergiques entraînant une neuroplasticité aberrante et anarchiques notamment au niveau striatal conduisant à l'émergence de complications avec fluctuations motrices et apparition de dyskinesies.

Bien souvent, l'administration d'agonistes dopaminergiques va permettre, d'une part, de potentialiser les effets de la L-Dopa, et d'autre part, de réduire la stimulation dopaminergique devenues pulsatiles retardant ainsi l'apparition des complications motrices.

Toutefois, dans 4 à 15% des cas, l'utilisation conjointe de L-Dopa et d'agonistes dopaminergiques va entraîner l'apparition des troubles du control impulsif avec notamment apparition d'un syndrome de dysregulation dopaminergique (DDS) caractérisé par une addiction aux traitements antiparkinsoniens de remplacement dopaminergique (L-dopa et/ou agonistes dopaminergiques). Dans le cas de la prise compulsive de drogues, la prise de substance entraîne des changements profonds et durables de la plasticité neuronale au niveau de structures spécifiquement impliquées dans les systèmes cérébraux de la récompense (VTA, striatum ventral/NAc et striatum dorsal) provoquant ainsi l'apparition du comportement addictif (prise excessive et incontrôlée, escalade dans les doses). Les symptômes des patients parkinsoniens présentant un DDS sont très proches de ceux décrits chez les personnes ayant développé une addiction aux drogues d'abus comme la cocaïne. Malgré ces fortes similitudes, il existe relativement peu d'étude qui teste l'activation des circuits de la récompense suite à un traitement aux DRT dans des modèles parkinsoniens. Ce projet s'intéressera plus particulièrement à ces phénomènes d'addiction aux médicaments dopaminergiques utilisés dans la maladie de parkinson (DDS). Il aura pour but d'apporter des éléments de réponse mécanistique quand à l'apparition de ces comportements addictifs qui font partie des effets indésirables des thérapies de remplacement dopaminergique. Pour cela, les conditions expérimentales seront définies de façon à se rapprocher le plus possible de la physiopathologie associée à la maladie de Parkinson. L'espèce animale qui sera utilisée dans cette approche expérimentale sera le Rat (*Rattus norvegicus*) Sprague Dawley OFA (le nombre d'animaux envisagé : 350).

845- En cancérologie, les patientes atteintes d'un cancer du sein avancé vont développer dans 70% des cas, des métastases à l'os qui, dans leur majorité (63%), vont répondre aux œstrogènes suggérant l'implication des hormones femelles dans les métastases osseuses. Or, très peu de choses sont connues à ce jour sur leurs mécanismes. Ces métastases sont généralement caractérisées par une destruction massive de l'os responsables de fortes douleurs, de fractures, et de compressions nerveuses pouvant entraîner des paralysies. Elles sont dans leur majorité incurables et seules des thérapies à visée palliatives sont aujourd'hui utilisées.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer l'impact des œstrogènes via l'étude de deux facteurs dans les mécanismes de mise en place des métastases osseuses et de l'évolution de la tumeur mammaire.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R : Pour la réduction du nombre d'animaux une étude pilote pour la mise en place du meilleur modèle de métastases osseuses via la comparaison de deux modes d'injection de cellules de cancer mammaire sera réalisée ne nécessitant pas d'étude statistique. Par la suite, afin d'étudier l'impact de nos facteurs d'intérêt dans les métastases osseuses, une étude (en fonction du mode choisi lors de notre étude pilote) avec des cellules modifiées pour ces facteurs sera effectuée nécessitant une étude statistique. Enfin une étude sur la glande mammaire qui nécessitera aussi une étude statistique sera réalisée. Le nombre total d'animaux pour cette étude se monte à n=80.

Concernant le raffinement, pour réduire la douleur, les souris seront systématiquement anesthésiées (-quelque soit les modes d'injection et avant la mise à mort) et seront sous antalgiques (acétaminophène) (48h avant les protocoles d'injection et 48h post-injection). Pour le bien-être des animaux, les cages seront enrichies, le temps d'acclimatation nécessaire respecté, avant injection et toutes anesthésies. La température des animaux sera maintenue grâce à l'utilisation de coussins chauffants. Un gel sera appliqué sur les yeux des souris pour éviter tout assèchement de la cornée. L'asepsie opératoire sera respectée, les injections, les suivis de protocoles étant réalisés en pièce de confinement de niveau L2 sous la responsabilité du porteur de projet. Tous signes de stress (comportement, activité motrice, posture) seront pris en compte ainsi qu'une pesée hebdomadaire sera effectuée et reportés pour chaque animal. Un suivi journalier sera effectué par le personnel animalier. Le change sera réalisé deux fois par semaine. Tout élément rentrant en contact avec les souris sera stérile. L'eau ainsi que la nourriture est ad libitum. Concernant des études de remplacement, les effets de ces facteurs pouvant être locaux (tumeurs) mais aussi impacter des organes à distance (rate), cette phase d'expérimentation animale est nécessaire et ne peut pas être substituée par des tests in vitro.

846- L'imagerie occupe une place centrale dans le diagnostic des spondyloarthrites (SpA).

La présence d'une sacroïlite identifiée en radiologie conventionnelle est en effet requise pour retenir le diagnostic de spondylarthrite ankylosante (SA) selon les critères classiques. Cette atteinte radiologique est cependant tardive, avec un retard de 7 à 10 ans par rapport aux premières manifestations cliniques. Les autres techniques d'imagerie n'ont pas répondu aux limites et défauts de la radiographie standard en termes de précocité du diagnostic et de prise en charge personnalisée. L'IRM a connu un développement ces dix dernières années dans les SpA que l'on peut qualifier de majeur

et s'est imposée dans l'évaluation actuelle des patients présentant des lombalgies inflammatoires récentes pour le diagnostic des formes récentes de SpA.

Elle occupe désormais une place centrale pour le diagnostic de SpA, permet d'évaluer l'activité inflammatoire des patients, de donner des indications sur la réponse thérapeutique et également sur le plan évolutif. Depuis quelques années, la tomographie par émission de TEP au fluorure de sodium (F18-FNa), pourrait se révéler une alternative intéressante. Elle allie une technologie innovante à un marqueur classique, alliant affinité élevé pour l'os et une clairance rapide, particulièrement intéressante pour dépister le remodelage osseux, de façon plus spécifique et plus sensible que la classique scintigraphie osseuse. L'exploration des rhumatismes inflammatoires, et plus particulièrement des spondyloarthrites, véritables polyenthésiopathies ossifiantes, devrait pouvoir en bénéficier. Nous avons souligné l'informativité de la TEP (18-FDG) chez le rat lors d'une mono-arthrite inflammatoire du genou, qui reproduit de manière fidèle certains aspects métaboliques et structuraux des rhumatismes inflammatoires humains, ce qui est impossible avec les modèles cellulaires (replaces).

Des résultats prometteurs ont été obtenus en 18-FNa TEP chez les patients pour caractériser la composante ostéitique pelvi-rachidienne caractéristique des spondyloarthrites. Une étude clinique est d'ailleurs en cours au CHU de Nancy. Pour valider ce concept physiopathologique, nous nous proposons d'étudier, de façon prospective, l'intérêt de la 18-FNa TEP, lors de la polyarthrite à adjuvant chez le rat qui associe des lésions inflammatoires périphériques (pattes) à des atteintes axiales progressivement ossifiantes, notamment à l'échelon caudal (nodules inflammatoires).

Dans cette étude 60 rats Lewis mâle seront utilisés : 4 témoins et 6 arthritiques à J4, J12 (début), J21 (acmé), J30 (début de l'ossification), J60 et J90 après induction (J0).

Ces effectifs sont indispensables pour pallier l'influence de la croissance des rats et de la variabilité des acquisitions TEP (réduire). En plus des paramètres cliniques (mesure de l'oedème, pesée régulière, examen clinique (points limites, refine), les données TEP (qualitatives et quantitatives) seront confrontées aux résultats radiologiques et histologiques à chaque temps étudié.

847- La Sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur essentiel à la régulation de l'humeur. Bon nombre d'antidépresseurs ciblent d'ailleurs son métabolisme ou ses différents récepteurs. Parmi ceux-ci, le récepteur 5-HT1B est une cible de choix pour comprendre l'implication du système sérotoninergique dans la pathologie anxio-dépressive. Le récepteur 5-HT1B présente la particularité d'être à la fois pré- et post-synaptique. C'est-à-dire qu'il est présent aussi bien sur les cellules qui sécrètent la 5-HT que sur leurs cibles. Il est par conséquent difficile d'attribuer une fonction à ce récepteur en fonction de sa localisation.

Ainsi, ce projet a pour but d'étudier le rôle spécifique du récepteur 5-HT1B précisément dans sa localisation post-synaptique.

Pour ce faire, un modèle génétique particulier va être utilisé. Il s'agit de souris KO conditionnel et tissu spécifique du 5-HT1B post-synaptique. Dans les faits, l'expression de 5-HT1B est bloquée dans le cerveau antérieur (ou forebrain), site où sont situées les cellules cibles des neurones sérotoninergiques, soit la localisation post-synaptique. La construction génétique utilisée permet de stopper l'expression du gène codant pour le 5-HT1B par la simple application d'un composé pharmacologique : la doxycycline (40 mg/kg de nourriture). Le blocage est donc contrôlable dans le temps et permet d'évaluer les effets de la suppression de 5-HT1B en fonction du moment de la vie de l'animal auquel cette suppression est effectuée.

La caractérisation comportementale de ce modèle ayant déjà été effectuée par le biais d'un travail collaboratif, notre objectif est ici de caractériser les effets neurochimiques de la suppression du récepteur 5-HT1B à différents moments de la vie de l'animal. Il s'agira, chez différents groupes animaux, de mesurer par microdialyse le niveau de sécrétion de dopamine dans le noyau accumbens, région du cerveau antérieur largement dépendante du système sérotoninergique. Ce noyau est décrit comme étant un centre majeur de la régulation de l'humeur aussi bien chez les rongeurs que les humains.

42 souris seront utilisées pour ce projet. Ce nombre d'animaux prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser in vitro ou in silico des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. Notre expérience se base sur un travail collaboratif et évite ainsi de devoir répéter la caractérisation comportementale de ce modèle ce qui contribue à limiter le nombre d'animaux. De plus, la technique de microdialyse qui sera utilisée permet de collecter plusieurs échantillons par animal sans le perturber permettant ainsi d'obtenir des données solides pour chaque souris. Par ailleurs l'ensemble de ce projet définit clairement des points limites au-delà desquels les animaux seraient sacrifiés en cas d'inconfort ou de souffrance.

Ce travail expérimental, permettra d'affiner les connaissances sur le rôle des récepteurs 5-HT1B dans la dépression. A terme nous pouvons espérer ainsi contribuer à l'identification de nouvelles stratégies dans le traitement de la pathologie dépressive.

848- Mesures sur coqs adultes caectomisés de l'énergie métabolisable et de la digestibilité des acides aminés des matières premières destinées à l'alimentation des volailles pour les mettre en corrélation avec les mesures faites avec un appareil à Infra Rouge (NIR)

En plus des analyses chimiques faites sur les matières premières, il est nécessaire de mesurer in vivo les coefficients de digestibilité de certains nutriments (acides aminés et énergie en particulier), les méthodes in vitro étant insuffisamment précises et discriminantes.

Pour ce faire, des coqs adultes ayant subi une ablation des caeca réalisée par le Chirurgien Agréé de l'EU sont utilisés comme modèle expérimental, modèle reconnu et largement utilisé dans le monde.

Des échantillons de quelques kilos suffisent pour être transformés en aliments qui sont administrés à des coqs après une mise à jeun. La période d'essai proprement dite dure 3 jours: ingestion de l'aliment par les animaux et collecte des fèces après digestion. Les analyses chimiques faites sur les matières premières avant ingestion et sur les fèces en fin d'essai (fraction non digestible) permettent par différence de calculer des coefficients de digestibilité des nutriments indispensables à une optimisation (technique et économique) des rations des volailles en production.

Sur une période de 5 ans, avec un effectif de 60 coqs, 400 à 500 échantillons de matières premières peuvent être ainsi analysés.

L'utilisation de coqs adultes permet, par la quantité relativement importante d'aliment ingéré et donc la quantité d'excrétas produits, de limiter à 12 répétitions (12 coqs) par aliment le nombre de mesures tout en conservant un coefficient de variation acceptable pour chaque série de mesures et partant, d'obtenir une bonne signification statistique de chaque résultat moyen (réduction)

Les coqs sont logés en cages individuelles spacieuses dans une salle climatisée (température et humidité constantes) et lumineuse; les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux de se voir sans possibilité de bagarre, ce qui contribue à leur confort (raffinement). Une alimentation en eau propre et en aliment complet ad libitum est respectée scrupuleusement (raffinement).

Effectuées par des personnels parfaitement formés selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, ces manipulations sont sans conséquence sur le devenir des animaux (raffinement).

La bonne gestion de la douleur éventuelle durant la mise en œuvre de la procédure est assurée par la prise en compte des « points limites adaptés » formalisée par l'utilisation systématique d'une grille d'évaluation conçue en concertation avec l'ensemble des acteurs chargés du Bien-être animal (SCBEA et opérateurs).

En plus d'une valorisation directe en formulation des aliments, ces données sont utilisées pour enrichir et compléter une base de données créée depuis plus de 20 ans (plus de 460 matières premières évaluées) et servant à l'amélioration et au développement d'une méthode d'analyse indirecte par Spectrométrie Infra Rouge (NIR). Cette méthode dite analyse NIR est largement déployée dans un réseau de clients au niveau mondial et permet de s'affranchir de l'utilisation des coqs pour les mesures de routine tout en apportant une réponse rapide aux besoins d'analyses (remplacement et réduction du besoin en animaux expérimentaux).

849- L'athérosclérose est l'une des premières causes mondiale de mortalité. Cette pathologie débute par une accumulation de lipides dans les artères déclenchant une réponse inflammatoire chronique. Plus précisément l'étape clé de la formation des lésions d'athérosclérose correspond à l'ingestion des lipoprotéines LDL accumulées dans l'artère par les macrophages (M ϕ) qui, couplée à un défaut d'élimination du cholestérol en excès dans ces M ϕ via les lipoprotéines HDL, va entraîner leur transformation en cellules spumeuses.

Le taux sanguin de HDL-cholestérol a été inversement corrélé au développement de maladies cardiovasculaires (MCV), et les HDL sont considérées comme athéroprotectrices (ce qui a conduit à appeler le cholestérol associé au HDL le 'bon cholestérol'). Cet effet protecteur a été principalement attribué à la fonction métabolique des HDL dans le "transport inverse du cholestérol" (RCT); processus par lequel les HDL captent le cholestérol cellulaire en périphérie, sont métabolisées au niveau vasculaire avant de délivrer ce cholestérol au niveau hépatique pour qu'il soit réutilisé ou éliminé par les fèces.

Toutefois, les grands essais thérapeutiques entrepris ces dernières années inhibant l'action de la CETP (acteur important du RCT chez l'homme) et augmentant de façon majeure le taux circulant de HDL-cholestérol n'ont pas mis en évidence de bénéfice sur le risque de MCV. Ces échecs ont donc mis en évidence un besoin urgent de mieux comprendre les voies participant au RCT in vivo pour le développement ou l'optimisation des nouveaux traitements thérapeutiques des MCV. Notre projet a donc pour objectif d'étudier les articulations métaboliques entre les différentes voies participant au RCT et leur rôle dans le développement de l'athérosclérose.

Afin de pouvoir répondre à ces objectifs scientifiques, nous utiliserons le modèle de la souris car il constitue le seul modèle préclinique à l'heure actuelle qui permette d'invalider ou d'induire l'expression de gènes de manière tissu-spécifique et donc de démontrer la fonction de ces gènes. Ce modèle est également incontournable car il a été validé par de très nombreuses études pour la modélisation de l'ensemble du métabolisme du cholestérol jusqu'aux aspects pathologiques de développement de l'athérosclérose. Ainsi, nous utiliserons des modèles de souris humanisées (exprimant un gène humain), traitées avec des inhibiteurs, ou invalidés pour des gènes clefs du RCT chez l'homme pour réaliser des expériences permettant d'évaluer leurs rôles dans le transport inverse du cholestérol in vivo, de la sortie du

cholestérol du macrophage jusqu'à son excrétion dans les fèces, ainsi que sur le développement des lésions lipidiques dans les artères.

Le nombre envisagé de souris pour réaliser cette étude est de :

-Evaluation des différentes voies participant au RCT in vivo : 240 souris

-Evaluation de l'impact des différentes voies participant au RCT sur le développement de l'athérosclérose : 100 souris.

Dans le souci de suivre une démarche respectant la règle des 3Rs, une stratégie de production des animaux multi-transgéniques nécessaires à l'étude sera suivie afin de réduire le nombre total d'animaux générés de génotype non désiré et donc sacrifiés. Si les souris femelles seront utilisées pour les études d'athérosclérose, parce qu'elles développent des lésions lipidiques plus importantes, nous utiliserons principalement les mâles pour les études d'exploration du RCT ce qui permettra d'optimiser également les portées d'animaux produites dans le cadre de ce projet. La taille des groupes expérimentaux a été optimisée afin de répondre aux besoins de mettre en évidence des différences statistiques et en prenant en compte les variations liées à chaque type d'expérience.

850- Ce projet a pour objectif de s'assurer de l'inactivation d'un vaccin antirabique destiné à l'Homme en tant que test de contrôle qualité assurant la mise sur le marché de lots de vaccins conformes aux normes de sécurité et d'activité. Les tests de contrôle qualité sont des tests réglementaires pour les vaccins commercialisés et pour les produits en développement..

Ce projet pourra engendrer l'utilisation d'au maximum 29000 souris sur une période de 5 ans.

Les protocoles encadrant la réalisation des tests d'inactivation n'entraînant pas habituellement de réactions locales ou générales ne présentent pas de risque pour les animaux excepté en cas d'anomalie d'inactivation, ce qui est exceptionnel, et dans les cas de qualification ou de validation. Dans le cas où les animaux présenteraient des réactions locales ou générales des soins appropriés seront réalisés. Tout animal qui présenterait une perte d'état général ou une maladie sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire.

. Les protocoles consistent en une injection dans le cerveau de la préparation vaccinale ou d'un témoin virus rabique sous anesthésie suivi d'une période d'observation.

A la suite, l'ensemble des animaux est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité Ethique et la Structure chargée du Bien-Être des Animaux.

Un vaccin correctement inactivé ne provoque pas de signes cliniques. Cependant en raison de la qualification des techniciens avec le virus rabique, le projet est classé comme sévère.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Des tests in vitro sont développés pour des vaccins antirabiques de nouvelle génération et devraient substituer le vaccin actuel dans les années futures.

Réduction:

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de tests sur la période (campagne de production des vaccins antirabiques). Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation et ne permet pas de réduire au-delà. La requalification des personnes est limitée au strict minimum en incluant une partie d'essais sans réveil des animaux et une seule dose de virus administrée.

Raffinement:

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (abris) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires.

En cas de signes cliniques, les animaux sont euthanasiés.

851- En cancérologie, les patientes atteintes d'un cancer du sein avancé vont développer dans 70% des cas, des métastases à l'os qui, dans leur majorité (63%), vont répondre aux œstrogènes suggérant l'implication des hormones femelles dans les métastases osseuses. Or, très peu de choses sont connues à ce jour sur leurs mécanismes. Ces métastases sont généralement caractérisées par une destruction massive de l'os responsables de fortes douleurs, de fractures, et de compressions nerveuses pouvant entraîner des paralysies. Elles sont dans leur majorité incurables et seules des thérapies à visée palliatives sont aujourd'hui utilisées.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer l'impact des œstrogènes via l'étude de deux facteurs dans les mécanismes de mise en place des métastases osseuses et de l'évolution de la tumeur mammaire.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R : Pour la réduction du nombre d'animaux une étude pilote pour la mise en place du meilleur modèle de métastases osseuses via la comparaison de deux modes d'injection de cellules de cancer mammaire sera réalisée ne nécessitant pas d'étude statistique. Par la suite, afin d'étudier l'impact de nos facteurs d'intérêt dans les métastases osseuses, une étude (en fonction du mode choisi lors de notre étude pilote) avec des cellules modifiées pour ces facteurs sera effectuée nécessitant une étude statistique. Enfin une étude sur la glande mammaire qui nécessitera aussi une étude statistique sera réalisée. Le nombre total d'animaux pour cette étude se monte à n=80.

Concernant le raffinement, pour réduire la douleur, les souris seront systématiquement anesthésiées (-quelque soit les modes d'injection et avant la mise à mort) et seront sous antalgiques (acétaminophène) (48h avant les protocoles d'injection et 48h post-injection). Pour le bien-être des animaux, les cages seront enrichies, le temps d'acclimatation nécessaire respecté, avant injection et toutes anesthésies. La température des animaux sera maintenue grâce à l'utilisation de coussins chauffants. Un gel sera appliqué sur les yeux des souris pour éviter tout assèchement de la cornée. L'asepsie opératoire sera respectée, les injections, les suivis de protocoles étant réalisés en pièce de confinement de niveau L2 sous la responsabilité du porteur de projet. Tous signes de stress (comportement, activité motrice, posture) seront pris en compte ainsi qu'une pesée hebdomadaire sera effectuée et reportés pour chaque animal. Un suivi journalier sera effectué par le personnel animalier. Le change sera réalisé deux fois par semaine. Tout élément rentrant en contact avec les souris sera stérile. L'eau ainsi que la nourriture est ad libitum. Concernant des études de remplacement, les effets de ces facteurs pouvant être locaux (tumeurs) mais aussi impacter des organes à distance (rate), cette phase d'expérimentation animale est nécessaire et ne peut pas être substituée par des tests in vitro.

852- Le terme « épigénétique » désigne des modifications assez stables de l'environnement biochimique des gènes, modifications susceptibles de modifier leur expression. La méthylation de l'ADN (fixation de groupements 'méthyle' sur l'ADN) est un exemple de modification épigénétique. Si ces phénomènes sont à l'œuvre dans le fonctionnement de routine des organismes, ils résultent parfois de l'impact de facteurs occasionnels, d'ordre climatique, nutritionnel, toxiques... Le projet expérimental présenté ici s'inscrit dans un programme de recherche agronomique débuté en 2010 visant à étudier et à valoriser les phénomènes épigénétiques chez le canard. Notre animal d'intérêt est le canard mulard, qui représente 95% de la production française de foie gras. C'est un hybride entre une cane commune et un mâle de Barbarie, deux espèces différentes, auxquelles nous nous intéressons également. L'idée de notre programme est d'induire une hypométhylation chez des canards par le biais d'un régime restreint en méthionine, un acide aminé donneur de groupements 'méthyle' et d'étudier les effets de cette modification épigénétique sur plusieurs générations, 1. au niveau zootechnique (croissance, consommation alimentaire, état d'engraissement corporel, rendement en foie gras...), 2. au niveau physiologique (paramètres sanguins du métabolisme des glucides et des lipides), 3. au niveau de l'expression des gènes dans divers tissus et 4. au niveau de l'ADN et sa méthylation. Le programme global comporte deux dispositifs expérimentaux (D1 et D2). Le présent projet expérimental se situe en 2013 et concerne la 3ème génération de D1 et la 2ème génération de D2. Pour atteindre les objectifs du projet, il est nécessaire d'avoir recours à des animaux car il n'y a pas de méthode substitutive pour répondre à la question scientifique posée. Le projet utilise de l'ordre de 450 animaux répartis en 370 animaux étudiés jusqu'à l'âge de 14 semaines (après gavage pour la plupart) et 80 reproducteurs (canes communes et canards de Barbarie) en fin de carrière, âgés de 1 ou 2 ans. Dans D1, les effectifs d'animaux expérimentaux gavés et disséqués ont été calculés de sorte qu'une différence de 10% entre les moyennes de 2 populations pour un caractère comme le poids du foie gras ou le poids du gras abdominal apparaissent comme significative. Cela implique des effectifs de l'ordre de 20 à 25 animaux par combinaison élémentaire sexe*type génétique*type épigénétique. Dans D2, à vocation plus appliquée, nous avons cherché à valider une différence de 5% entre 2 moyennes, ce qui conduit à des effectifs de 50 mulards gavés par type élémentaire. Les effectifs de reproducteurs ont été calculés de façon à obtenir les effectifs de descendants requis. Deux procédures expérimentales, de classe légère de sévérité, seront mises en œuvre au cours de ce projet : mesure TOBEC (conductivité électromagnétique corporelle) et prises de sang.

853- La maladie de Huntington est une pathologie rare causée par une mutation autosomale dominante (pénétrance totale) dans le gène codant la protéine huntingtine. Au stade avancé de la maladie, les signes cliniques sont des mouvements anormaux balistiques incontrôlables (chorées), une réduction significative dans la capacité d'exécuter des mouvements volontaires et des déficits cognitifs et psychiatriques. Les troubles cognitifs précèdent les troubles moteurs au stade pré-symptomatique, ceci résultant d'un dysfonctionnement neuronal progressif et chronique du striatum et de certaines aires corticales et sous-corticales. Malgré des efforts de recherche menés depuis des décennies, il n'existe pas actuellement de traitement efficace pour cette maladie. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle molécule administrée par voie orale dans un modèle animal de la maladie de Huntington. L'efficacité de cette molécule pour ralentir le développement de la pathologie a déjà été démontrée chez le rongeur dans d'autres modèles de maladies neurodégénératives. L'ultime étape avant de passer à une évaluation clinique chez les malades, consistera à tester sa sécurité et son efficacité chez le primate non humain. L'évaluation thérapeutique sera menée en utilisant des techniques indolores et non invasives telles que l'imagerie IRM et l'étude des comportements moteur et cognitif spontanés. Elle sera complétée par de l'histopathologie post-mortem. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (16) a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet du traitement à deux doses différentes. Le modèle primate se justifie par la possibilité d'évaluer les fonctions cognitives dans une espèce proche de l'homme en utilisant les mêmes dispositifs et tests disponibles en clinique. De même, la résolution des images IRM permet d'appliquer le même suivi longitudinal chez l'animal et chez l'homme afin de disposer d'index prédictifs de la maladie et de sa progression avant, pendant et après traitement.

Les procédures en imagerie et comportement n'induisent pas de douleurs et elles sont donc classées au niveau léger. La seule procédure classée au niveau modérée est la procédure chirurgicale utilisée qui consiste à implanter un dispositif sous-cutané pour une administration intra-gastrique évitant la répétition de manipulations stressantes des animaux lors des administrations du traitement pendant 1 mois. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie pour cette chirurgie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Le modèle mis en œuvre reste pré-symptomatique et donc sans complications motrices ou cognitives apparentes. Les examens d'imagerie sont non invasifs et permettent d'obtenir des informations sur l'anatomie et la fonctionnalité du cerveau sans nécessiter une chirurgie ou des prélèvements/biopsies. Le projet s'inscrit dans une démarche translationnelle. Il permettra, à terme, de valider au stade préclinique une nouvelle stratégie thérapeutique pour améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients atteints de la maladie de Huntington.

854- La présente saisine concerne une plateforme mutualisée dont une des missions est la génération de cellules pluripotentes induites (iPSC) utilisées en médecine régénérative. Il est nécessaire que la pluripotence des iPSC produites par la plateforme soit validée. L'essai reconnu dans la littérature scientifique pour affirmer cette pluripotence est la présence de types cellulaires caractéristiques des feuilletts germinaux (endoderme – système digestif ; mésoderme – cellules mésenchymateuses ; ectoderme – tissu neural) au sein de tératomes induits par injection des iPSC. Pour cela, des cellules iPSC seront injectées dans des souris immunodéprimés, sous la capsule testiculaire, puis les souris seront surveillées quotidiennement jusqu'à la formation de tératomes (perte de poids, posture, taille de la tumeur). Cette procédure est la procédure qui permet le plus grand taux de succès de l'expérience, ce qui limite le nombre d'animaux utilisés. Les souris seront ensuite sacrifiées, puis les tératomes seront extraits et fixés. Les tératomes fixés seront ensuite transmis à un service d'anatomo-pathologie pour analyse et expertise. Lors de la première expérience, nous commencerons par injecter 4 animaux pour évaluer la pluripotence d'un clone d'iPSC, puis en fonction du degré de réussite, nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés pour valider les clones iPSC suivants. Nous pensons devoir tester entre 5 et 10 clones par an. Au maximum, cette procédure concerne donc 200 animaux pour la durée de ce projet (5 ans).

855- La myéline est une gaine essentielle à la fois pour l'isolation et la protection de chaque nerf du cerveau et de la moelle épinière et à la conduite normale des messages nerveux d'une partie du corps à une autre. La régénération de la myéline est devenue le principal objectif thérapeutique dans les maladies démyélinisantes telles que la sclérose en plaques. Récemment, nous avons montré que le traitement avec une dose physiologique de testostérone stimule efficacement la formation de myéline et répare les lésions de la myéline dans un modèle expérimental de la démyélinisation chronique. Le traitement par la testostérone favorise la remyélinisation en stimulant le recrutement et la différenciation des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC). Fait important, le récepteur neuronal des androgènes (AR) a été identifié comme une nouvelle cible thérapeutique pour la régénération de la myéline car la testostérone ne stimule pas la formation de nouvelles gaines de myéline chez des souris dont le récepteur AR est invalidé spécifiquement dans les neurones et les cellules gliales (souris ARNes/Cre). La suite de ce travail sera consacrée à l'étude des mécanismes de signalisation de l'AR dans la maturation des OPCs et la réparation de la myéline. Pour cela, un modèle expérimental approprié pour induire une démyélinisation in vivo sera utilisé suite à une démyélinisation aiguë focale des axones par l'injection stéréotaxique de la lysophosphatidyl-choline (LPC) dans la moelle épinière de la souris. Notre but est de chercher 1) les cellules cibles, exprimant l'AR (neurones et/ou cellules gliales); 2) les gènes cibles de l'AR impliqués dans le recrutement des OPCs et leur différenciation en oligodendrocytes myélinisants. Pour cela, nous allons utiliser des souris transgéniques chez lesquelles l'AR est inactivé sélectivement dans les différents types de cellules du cerveau et de la moelle épinière (neurones et cellules gliales). La règle de 3 R (réduire, raffiner et remplacer) sera appliquée le long de ce programme de recherche. Le nombre d'animaux sera réduit à 6 par point expérimental, le minimum requis lors de nos travaux précédents de façon à mettre en évidence des différences statistiques avec un risque d'erreur moins que 5%. La méthodologie expérimentale est optimisée pour utiliser le strict nécessaire d'animaux, appartenant à la même lignée. Nous espérons à travers ce projet identifier les éléments (type de cellules et de gènes) intervenants dans la réparation de la myéline, effet important dans la thérapie de la sclérose en plaques.

856- La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains. Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps, affinitines, liposomes, etc ...) et de plusieurs radioéléments (Astate 211, Iode 131, Lutetium 177, yttrium 90, Scandium 47, cuivre 67, etc ...), certains connus qui servent de références et des nouveaux, produits en particulier par le cyclotron Arronax. La mise en œuvre de nos protocoles nécessite donc un calendrier contraint de production de radioéléments et de préparation du radiopharmaceutique afin de réaliser nos expérimentations.

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

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

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

Cette demande d'autorisation concerne 215 souris nues, 60 C57BL6KaRij, 30 C57BL/6 CEA transgéniques et 30 SCID beiges.

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

857- Les relations temporelles entre des événements signifiants forment notre mémoire et permettent de développer une réponse adaptée en fonction des événements à venir.

L'objectif scientifique de ce projet est de déterminer le rôle de différentes structures cérébrales et des réseaux qu'elles forment dans la mémorisation temporelle lors d'un conditionnement émotionnel simple dans lequel un stimulus initialement neutre est associé à un stimulus inconditionnel aversif ou appétitif. Nous cherchons à comparer cette mémorisation au début de l'apprentissage et après surentraînement lorsque les règles temporelles de la situation sont modifiées. Pour cela nous enregistrerons l'activité neuronale en parallèle dans différentes aires cérébrales chez le rat et réaliserons une analyse fréquentielle et temporelle des synchronisations d'activité au cours de la tâche. Cette analyse nous indiquera si une structure neuronale donnée participe au traitement prospectif de l'information et à l'anticipation temporelle de l'arrivée du stimulus inconditionnel, ainsi que s'il existe un couplage fonctionnel entre certaines des structures étudiées. Cette étude nécessite l'implantation d'électrodes intracérébrales pour permettre l'enregistrement des réponses neuronales chez l'animal éveillé au cours de la tâche comportementale. Il n'y a donc pas de méthode alternative.

Le conditionnement Pavlovien est le prototype de l'apprentissage associatif. Il est connu pour produire des réponses similaires et mettre en jeu les mêmes types de circuits neuronaux chez le rat et chez l'Homme. Or, la finalité de ce projet est de comprendre l'encodage temporel chez l'Homme car ce type de mémorisation est déficient dans certaines pathologies (par ex. l'autisme ou la maladie de Parkinson). De plus, ce projet nous permettra de mieux définir les mécanismes impliqués dans la mémorisation associative ainsi que dans l'adaptation au changement de l'environnement, processus essentiels à la survie. Pour obtenir une bonne puissance statistique cela requiert 8 à 12 animaux par groupe, ce qui compte-tenu de la difficulté de la technique (enregistrement simultané in vivo de trois structures) nécessite l'implantation de 24 rats par groupe. Le taux de réussite est variable en fonction des structures ciblées. Pour chaque réseau étudié, nous avons 8 conditions expérimentales ce qui représente donc au total 192 rats. Ces conditions permettront de comparer conditionnement appétitif et aversif ainsi que le début de l'apprentissage et le surentraînement tout en testant l'effet de deux conditions temporelles. Pour optimiser le nombre de rats, l'expérience sera arrêtée dès que nous obtiendrons un effet significatif fiable.

858- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une affection grave, caractérisée par une élévation des résistances artérielles pulmonaires, faisant obstacle à l'éjection du ventricule droit et compromettant le débit cardiaque. Plusieurs anomalies fonctionnelles et structurales de la paroi vasculaire pulmonaire participent au développement de l'HTAP incluant : une hyperplasie des cellules musculaires lisses avec hypertrophie médiale et intimale, une accumulation de matrice extracellulaire, une raréfaction vasculaire avec réduction de la densité capillaire périphérique. Outre la transplantation pulmonaire dont les résultats restent insatisfaisants, il n'existe actuellement aucun traitement disponible de l'HTAP dans ses formes graves. Définir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'HTAP représente donc un objectif prioritaire.

L'objectif général est de réduire l'activité proliférative des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires en agissant sur des voies impliquées dans le mécanisme de sénescence cellulaire. L'hypothèse est que l'induction d'une sénescence cellulaire permet de protéger contre le développement ou corriger une HTAP déjà constituée.

Le recours à l'étude de modèles expérimentaux et à l'utilisation d'animaux transgéniques invalidés pour le gène de voies de transduction du signal de sénescence cellulaire (p53, p21, p16), de la télomérase et de ses sous unités (protéine TERT et ARN Terc), ou de médiateurs libérés de façon excessive par les cellules sénescence comme l'ostéopontine, est essentiel. Cette démarche est associée à l'utilisation de médicaments développés pour favoriser ou bloquer la sénescence cellulaire.

859- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à un groupe de maladies d'évolution progressive caractérisée par une augmentation de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, dont le symptôme principal est un essoufflement à l'effort. Cette maladie évolue vers la défaillance cardiaque droite et la mort, à moins d'une transplantation pulmonaire ou cardiopulmonaire, un geste chirurgical ayant des conséquences lourdes et des résultats qui restent insuffisants (50% des patients qui en bénéficient sont en vie 5 ans après la transplantation). Des traitements innovants ont permis d'atténuer les symptômes et d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients.

Toutefois, le pronostic de l'HTAP reste effroyable avec une survie à 3 ans de l'ordre de 60% dans les formes incidentes de la maladie. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques complexes de l'HTAP est indispensable pour développer de nouveaux traitements et améliorer la survie de ces patients. En effet, les mécanismes conduisant à une HTAP sont encore peu connus à ce jour, ce qui rend complexe la mise en place de nouveaux traitements.

Plusieurs acteurs entrent en jeu au cours de l'HTAP : cellules endothéliales et cellules musculaires lisses constituant les artères pulmonaires, cellules inflammatoires et enfin cellules cardiaques. Bien que notre laboratoire travaille sur des cultures de ces types cellulaires, seule l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble de ces acteurs au sein d'un même modèle, dans un environnement physiologique ou pathologique. Actuellement, notre unité travaille à la mise en place d'une large collection d'échantillons humains provenant de patients souffrant de cette maladie rare et fatale. Chaque hypothèse thérapeutique testée sur les modèles expérimentaux, découle d'observations réalisées au travers de ces échantillons.

Les modèles animaux d'HTAP sont des outils très importants qui permettent le suivi de la mise en place des différents mécanismes physiopathologiques de la maladie dans le temps. En effet, l'accès à différents stades de la maladie est possible lorsque les animaux sont étudiés à différents stades de l'induction de HTAP. Ceci n'est pas possible chez l'Homme puisque la maladie est très difficile à diagnostiquer et est donc très souvent détectée à des stades tardifs lorsque la maladie est déjà installée depuis plusieurs mois/années.

L'utilisation des modèles animaux tels que le rat « monocrotaline », régulièrement utilisés dans de nombreuses publications, issues de différentes équipes de recherche est un réel apport et un outil indispensable pour nos travaux de recherche.

Les effets sur l'HTAP, de l'interaction tPA/Récepteur NMDA (NMDAR), ne peuvent être étudiés que par la mesure des paramètres hémodynamiques (pressions et résistances vasculaires pulmonaires, hypertrophie/défaillance cardiaque droite) et une analyse du remodelage vasculaire pulmonaire et cardiaque. Par conséquent, l'utilisation de cultures cellulaires n'est pas en adéquation avec notre objectif.

L'immunisation de ces animaux contre le domaine du NMDAR clivé par le tPA, permettra de préciser si oui ou non cette interaction joue un rôle dans la pathologie et s'il est bénéfique, d'avancer une nouvelle stratégie thérapeutique applicable à l'homme. Pour atteindre cet objectif, 80 rats Spragues-Dawley seront utilisés au maximum, afin d'obtenir des résultats statistiquement analysables et interprétables.

860- Le succès de la thérapie génique repose sur l'efficacité et la pertinence de vecteurs de transfert de gène, capables, après administration in vivo de transduire/transférer les organes d'intérêt. Ces vecteurs sont principalement de deux types: viraux et non-viraux.

Les premiers sont principalement utilisés dans les essais cliniques en cours et de nombreuses pathologies commencent à être guéries par ces thérapies innovantes.

Dans le cas des seconds, la situation est moins favorable. En effet, les vecteurs non-viraux (aussi appelés synthétiques) montrent en général une très faible efficacité in vivo.

A ce jour, un seul composé (GL67 A) est utilisé chez l'homme, dans le cadre d'un essai clinique de traitement de la mucoviscidose.

Ces vecteurs synthétiques sont en fait des composés organiques (dendrimères, polymères, liposomes, etc. ...) capables de former, en présence d'ADN, des nanoparticules par auto-assemblage. Le processus classique d'étude et développement de ces composés comprend une caractérisation biophysique des particules formées, une évaluation de leur toxicité et efficacité in vitro et seuls ont été testés in vivo les composés montrant une efficacité in vitro. Cependant, les études publiées semblent indiquer qu'il y a un découplage entre activité in vitro et in vivo et que l'efficacité in vitro ne prédit pas l'efficacité in vivo.

Dans ce cadre général, notre groupe de recherche propose une approche systématique visant à cribler directement in vivo des formulations qui ne sont pas toxiques sur la base de tests cellulaires en culture et qui ne sont pas forcément efficaces in vitro. Pour faciliter ce criblage, nous utilisons l'imagerie de l'expression génique "corps entier" qui permet de détecter un transfert de gène ectopique. La méthodologie utilisée est le SPECT/CT.

La visualisation de l'expression génique in vivo nécessite trois éléments: un gène rapporteur, un traceur et un scanner capable de détecter en trois dimensions (si possible) la biodistribution de ce traceur. Dans notre cas, nous utilisons i) un scanner SPECT/CT dédié aux petits animaux, ii) le Na/I symporteur (NIS) comme gène rapporteur, qui code pour une protéine membranaire permettant l'entrée d'iodure dans les cellules qui l'expriment et iii) ¹²³I ou un analogue ^{99m}TcO₄ comme traceur. Grâce à cette technique, il est donc possible de déterminer le profil d'expression du transgène induit par une formulation non-virale et une étude déjà publiée nous a permis de caractériser un dendrimère permettant un transfert de gène tumeur-spécifique après administration systémique.

Notre programme de recherche vise à utiliser cette méthodologie pour caractériser de nouvelles formulations non-virales susceptibles de transférer les poumons, les muscles squelettiques et/ou le foie.

861- L'objectif général du projet est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la survenue de l'insuffisance cardiaque et des troubles du rythme. Trois domaines sont explorés, l'énergétique, les mouvements calciques et les nucléotides cycliques. Le projet vise à la caractérisation des cascades de signalisation

intracellulaires impliquées dans le développement de ces pathologies. Le but de ces travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires et de développer à plus long terme des thérapies nouvelles. L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire. Des souris normales et transgéniques sont utilisées afin de comprendre l'implication de ces voies de signalisation dans la fonction cardiaque et vasculaire. L'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures de bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont sacrifiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les trois domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés (principalement muscles squelettiques, cœur et vaisseaux). Des études cellulaires sont effectuées dans la mesure du possible afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Un total de 170 souris est utilisé pour le projet.

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

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

Les potentialités de séquestration, qu'elle soit en amont (au sein du sol contaminé) ou durant la digestion (apport du séquestrant via l'aliment) apparaissent comme des voies prometteuses de gestion de ce risque. La détermination de l'efficacité de cette séquestration est un enjeu majeur.

Plusieurs travaux ayant trait à la problématique de la séquestration de polluants organiques (PCB) ont déjà été valorisés au sein de notre laboratoire, mais une telle approche comparant deux méthodes de séquestration n'a pour le moment pas été menée, notamment sur la CLD. Dans les possibles applications de terrain de ce projet, ces deux séquestrations renvoient à deux applications (dépôt de séquestrant sur le sol vs apport alimentaire de ce séquestrant) ayant des conséquences économiques distinctes (notamment du fait des quantités différentes de séquestrant nécessaire suivant ces modalités de maturations) Le projet consiste à caractériser l'impact de la séquestration de la CLD par le charbon actif (CA), en simulant les conditions réelles d'exposition chez le porc. Les résultats obtenus seront consignés d'une part dans une base de données en vue d'alimenter un modèle générique permettant de simuler la contamination d'un animal élevé en plein air suivant les méthodes d'élevage utilisées.

Pour se faire 24 porcelets mâles castrés et sevrés (35 jours) prendront part à cette expérimentation. Le recul que nous avons pu obtenir sur cet animal et ce type de séquestration des contaminants, nous permet de fixer un nombre raisonné de répétition (n=4) pour obtenir des résultats scientifiquement probants. Il ne peut être envisagé de remplacement sur cette thématique et les animaux seront mise à mort après l'expérimentation.

Même si les porcelets sont exposés à un polluant toxique (la chlordécone) la dose mimera une exposition environnementale. En se reportant aux seuils toxicologiques, il apparaît que les doses employées ne devraient pas engendrer de troubles ou de la souffrance pour les animaux. Toutefois, un maintien en cage individuelle apparaît nécessaire pour limiter les contaminations croisées entre individus. Les conditions de l'animalerie ont été optimisées pour réduire au mieux l'impact de ce maintien : le contact visuel et olfactif seront préservés. De même des éléments assurant la distraction des porcelets seront ajoutés dans les cages.

863- Les cellules ciliées externes (CCE) de l'oreille interne sont les cellules sensorielles qui permettent l'amplification du stimulus initial provoqué par un son dans la cochlée, l'organe de l'audition. La structure réceptrice est composée de très longues microvillosités (les stéréocils) organisées en rangées de taille croissante. L'extrémité apicale des plus grands stéréocils est ancrée dans un gel acellulaire, la membrane tectoriale. C'est le déplacement de la touffe ciliaire par rapport à la membrane tectoriale qui provoque directement l'ouverture de canaux ioniques (transduction mécanoélectrique). Les objectifs du projet sont d'identifier les molécules et les mécanismes permettant la mise en place, le maintien et le fonctionnement de cet ensemble mécanorécepteur (touffe ciliaire des CCE + membrane tectoriale). Ces travaux devraient également permettre d'identifier de nouveaux gènes de surdité.

La cochlée est un organe très complexe, contenant de très nombreux types cellulaires. D'autre part, il n'existe pas de lignées de cellules sensorielles cochléaires. De ce fait, on ne peut pas en étudier le fonctionnement dans des modèles *in vitro* et le recours à l'animal est indispensable pour analyser les conséquences de l'inactivation d'un gène sur le développement de la cochlée ou la physiologie cochléaire. Le choix de cette espèce est motivé par la possibilité d'inactivation génique (knock-out/knock-in, inactivation conditionnelle) et l'existence de nombreux mutants naturels sourds. Le nombre d'animaux utilisé pour ce projet est d'environ 2400 en raison de l'exploration de nombreuses lignées mutantes pour des gènes associées à des surdités. Toutes les interventions sur les animaux relèvent d'une classe de sévérité légère. Le suivi régulier des animaux permettra néanmoins de s'assurer qu'aucun ne développe de pathologie inattendue.

Ce projet nous permettra d'explorer de nouveaux modèles utiles pour comprendre et soigner des surdités de l'Homme.

864- La compréhension de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA) est cruciale dans le développement des nouveaux traitements. Il existe une relation étroite entre les dépôts amyloïdes, également présents dans l'angiopathie amyloïde cérébrale et la présence de lésions vasculaires hémorragiques et/ou ischémiques. Cependant aucune donnée n'est disponible sur la cinétique de formation de ces dépôts amyloïdes en fonction des lésions vasculaires.

Objectif

Cette étude se propose d'identifier la cinétique des dépôts amyloïdes en fonction des lésions vasculaires hémorragiques ou ischémiques cérébrales chez la souris sauvage et génétiquement modifiée.

Méthodes

Nous constituerons 6 groupes murins composés de 25 souris dans chaque groupe, sauvages SHAM, sauvages avec hémorragies, sauvages avec ischémies; APP21 SHAM, APP21 avec hémorragies et APP21 avec ischémie. Les opérations seront effectuées sous anesthésie sur des souris âgées de 10 semaines. Nous analyserons les lésions vasculaires et les dépôts amyloïdes de façon répétée jusqu'au 12^{ème} mois à travers des séquences acquises en IRM à 7T, par l'imagerie fonctionnelle MicroPET/CT couplée à un radiotracer pour l'amyloïde, en parallèle d'une étude comportementale et de l'analyse du taux d'a bêta dans le sang. Nous compléterons par colorations histo-pathologiques post-mortem et l'analyse du taux d'a bêta dans le LCR des souris lors du sacrifice.

Résultats attendus et perspectives

La cinétique des dépôts amyloïdes devrait être modulée par la nature et l'ampleur des lésions vasculaires, ce qui viendra conforter l'hypothèse d'une cascade mixte (amyloïde et vasculaire) dans la genèse de la MA. Ce modèle expérimental permettra à terme la modulation pharmacologique de ces lésions avec des conséquences cliniques thérapeutiques pratiques à long terme.

865- Les objectifs généraux de ces procédures sont d'étudier

(i) les principaux facteurs de variation de la dépense énergétique du chien et du chat, notamment en fonction de leur composition corporelle et donc de leur embonpoint,

(ii) les variations concomitantes de sensibilité à l'insuline dont la baisse est à l'origine de multiples désordres métaboliques en général considérés comme secondaires à l'embonpoint et

(iii) certains facteurs de variation de l'utilisation de l'énergie des rations, principalement au niveau digestif, dans la mesure où l'on est continuellement à la recherche de formules de haute qualité nutritionnelle et «environnementale» sans toutefois que cela expose les animaux à des risques de surconsommation d'énergie avec les conséquences délétères que cela implique.

Pour poursuivre ces objectifs, nous sommes susceptibles de mettre en œuvre de manière récurrente, sur les animaux, chiens et chats, de notre animalerie cinq procédures, résumées ci-dessous et décrites en détail au chapitre 4.

1. Détermination de la composition corporelle par dilution d'eau deutérée (2H2O)

L'objectif est de déterminer la composition corporelle qui est en effet un élément déterminant de la dépense énergétique. La procédure consiste en deux prélèvements de sang, l'un basal, l'autre 2 ou 4 heures après injection d'une dose d'eau deutérée (au maximum 500 mg/kg).

2. Détermination de la sensibilité à l'insuline par la technique du clamp euglycémique hyper-insulinémique

Cette méthode est la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité à l'insuline. Pendant quatre heures, les animaux sont équipés de deux cathéters permettant la perfusion d'insuline et de glucose, d'une pari, et des prélèvements de sang, d'autre part.

3. Détermination de la dépense énergétique au repos par la méthode des échanges respiratoires

La dépense énergétique est fortement corrélée à la production de dioxyde de carbone et au quotient respiratoire (CO₂ produit/O₂ consommé) qui indique la nature des substrats oxydés.

Les animaux sont placés pendant au maximum 24 heures (détermination d'autant plus précise que la durée d'enregistrement est plus longue) dans une cage assujettie à un dispositif assurant la ventilation et la mesure de la concentration en gaz de l'air entrant (inspiré) et sortant (exhalé) de la cage.

866- Les objectifs de notre projet sont de valider avec nos protocoles expérimentaux un modèle endogène de dépression, les rats Wistar Kyoto (WKY), et de vérifier l'efficacité antidépressive de notre molécule MAP4343 sur cette

souche. L'effet antidépresseur de MAP4343 chez le rat de la souche Sprague-Dawley (SD) a précédemment été démontré avec un modèle de dépression basé sur un stress chronique de type isolement social. Le modèle de dépression Wistar Kyoto a très bien été décrit dans la littérature et cette souche de rat est naturellement prédisposée à un comportement de type

« depressive-like » et anxieux. Les avantages d'utiliser cette souche comme modèle de dépression est que les animaux n'ont pas besoin d'être soumis à un protocole de stress pour induire des altérations comportementales. Cela évite également la variabilité de réponse subjective à un modèle chronique de stress qui est présent chez d'autres souches de rat. Tout ceci permet d'être en conformité avec les exigences de réduction et de raffinement. En effet, la souffrance et le nombre d'animaux est réduit en comparaison au modèle basé sur un stress chronique.

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

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

867- Notre projet de recherche consiste à essayer de démontrer le potentiel d'un tout nouveau traitement de pathologies gravissimes et souvent mortelles. Celles-ci sont très diverses et peuvent aller des accidents vasculaires cérébraux aux crises cardiaques, en passant par les septicémies (infections généralisées), les insuffisances rénales aiguës, ou encore les effets secondaires des opérations à cœur ouvert ou des transplantations d'organes. Toutefois, ces pathologies apparemment très différentes partagent des causes communes et se ressemblent donc dans une certaine mesure.

Comme ces pathologies sont également très complexes et font intervenir un nombre important d'acteurs (c'est-à-dire de cellules) au niveau de notre organisme, les chercheurs doivent absolument développer des médicaments qui pourront avoir des effets bénéfiques et protecteurs sur tous ces acteurs. Notamment, des molécules agissant sur un seul de ces acteurs se sont révélées largement insuffisantes pour contrer ces pathologies. Il nous faut donc avoir recours à des molécules elles-mêmes très complexes, par exemple des protéines naturellement présentes dans notre organisme. En particulier, une protéine qui empêche que notre sang ne coagule trop, l'antithrombine, constitue une possibilité très attrayante.

Nous savons que cette protéine peut être bénéfique et protectrice lorsque nous la testons dans des tubes à essais mais les pathologies ciblées sont tellement complexes qu'il nous faut absolument vérifier qu'elle fonctionne au moins chez la souris avant de la tester chez l'homme. Nous nous proposons dans ce projet de démontrer tout le potentiel protecteur de cette protéine en nous focalisant sur un exemple de pathologies que nous ciblons, l'insuffisance rénale aiguë, une pathologie qui peut être reproduite facilement chez la souris.

868- Nous définissons des vecteurs pour le diagnostic, la thérapie ciblée et la définition des limites des cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS). Nous avons déjà testé et validé des molécules dans plusieurs modèles cellulaires in vitro. Nous devons maintenant étudier la biodistribution de ces vecteurs et évaluer si leur utilisation, couplée à des techniques d'imagerie optique, améliore la qualité de la résection tumorale in vivo. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Dans ce cadre, les souris Nude immunodéficientes représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris Nude seront hébergées par 4 dans des cages à 25°C et 30-50% d'hygrométrie, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, avec une alternance jour/nuit de 12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. 4 à 5 jours d'acclimatation sont laissés avant le début des expérimentations. Les souris sont observées quotidiennement et pesées 2 fois par semaine. Des cellules tumorales humaines de cancer des VADS peuvent être implantées en orthotopique au niveau du plancher buccal et de la langue des souris. Cependant, la forte progression tumorale dans ce modèle orthotopique, due à la dissémination tumorale importante créée par pression hydrostatique lors de l'injection cellulaire, est incompatible avec une alimentation normale, ce qui limite l'étude des métastases et la détection d'une éventuelle efficacité thérapeutique des nouvelles molécules testées.

Pour cette raison, nous réaliserons des implantations intra-jugales de copeaux tumoraux obtenus à partir de tumeurs des VADS sous-cutanées. Une tumeur implantée en sous-cutané chez la souris Nude permettra l'implantation de tumeurs orthotopiques chez 6 souris. Ce modèle orthotopique permettra de ralentir la croissance tumorale et d'augmenter la survie des souris.

Dans ce projet nous utiliserons 60 souris Nude :

- Premièrement, nous évaluerons la biodistribution par imagerie optique non invasive des meilleurs vecteurs validés in vitro (7 molécules), dans le modèle orthotopique de cancer des VADS. D'après notre expérience, 3 animaux par condition expérimentale permettent une analyse fiable de la biodistribution, prenant en compte les variabilités inter-individu. Nous

implanterons donc des tumeurs humaines sous-cutanées chez 4 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 21 souris.

- Deuxièmement, nous comparerons la qualité de la résection tumorale aidée de l'imagerie de fluorescence, après injection de molécule fluorescente par voie intraveineuse ou péri-tumorale, à la résection macroscopique (3 groupes). Nous réaliserons l'exérèse des tumeurs sans toucher à l'intégrité de la langue, ce qui permettra la survie des souris après l'explantation tumorale. Nous surveillerons l'apparition de métastases ganglionnaires cervicales ou une rechute tumorale par imagerie optique. Les marges d'exérèse de la tumeur seront analysées histologiquement pour estimer si l'imagerie permet d'améliorer la qualité de l'exérèse. 10 souris par condition sont nécessaires à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous implanterons donc des tumeurs humaines sous-cutanées chez 5 souris pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 30 souris.

869- La fibrose hépatique est la résultante commune aux maladies chroniques du foie, caractérisée par l'accumulation anormalement élevée de constituants de la matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique. Sa progression peut conduire à la cirrhose.

Le diagnostic et l'évaluation du degré de la fibrose hépatique, est essentiel à la prise en charge des patients. Il existe différentes méthodes d'évaluation de la fibrose hépatique au cours des hépatopathies chroniques: par la ponction biopsie hépatique « PBH » ou par des tests non invasifs tel que les dosages de marqueurs sanguins «fibromètre» ou l'élastographie impulsionnelle ultrasonore. Actuellement la PBH reste l'examen de référence pour le diagnostic de la fibrose. Cependant, les études faites chez l'homme montrent, que ce gold standard est imparfait. En effet, la performance diagnostique de la biopsie hépatique peut être influencée par divers paramètres tels que la taille du prélèvement, la variabilité inter-observateur Pour pallier à ces imperfections, nous avons mis au point une technique de diagnostic automatique de lésions hépatiques telles que la fibrose significative et la cirrhose chez l'homme à partir de PBH humaine. Cependant cette technique doit être améliorée notamment en termes de performance diagnostique. Devant le faible échantillonnage et la disponibilité des biopsies humaines, le petit animal permettrait de disposer d'un excellent gold standard (diagnostic anatomopathologique et morphométrie automatique) du fait d'une analyse sur organe entier. Cette étude devrait nous permettre d'augmenter la performance diagnostique, de la PBH chez l'humain.

870- Etude systématique des effets du baclofène sur les 3 grands systèmes de neurotransmetteurs cérébraux (dopamine, sérotonine, noradrénaline), in vivo, dans différentes conditions (contrôles naïfs, administration chronique d'alcool, sevrage en alcool). Avec l'étude dans un second temps des influences potentielles de régions du cerveau riches en récepteurs gaba-B sur ces systèmes de neurotransmetteurs.

L'objectif est de mettre en évidence des actions encore inconnues du baclofène sur plusieurs systèmes fonctionnels cérébraux susceptibles de rendre compte des observations cliniques.

871- 1-Objectif scientifique du projet:

L'objectif de l'étude est de définir la pertinence d'une stratégie thérapeutique basée sur le ciblage de la voie apoptotique des récepteurs à dépendance à Shh dans le traitement de tumeurs et de définir les mécanismes moléculaires d'action de cette stratégie. En effet, les récepteurs à dépendance ont la particularité d'induire la mort cellulaire en absence de leur ligand et il a déjà été montré pour divers récepteurs à dépendance que la privation de leur ligand avait un effet anti-tumoral. De plus des résultats obtenus in vitro nous ont permis de montrer que l'interférence avec le ligand Shh, ligand des récepteurs à dépendance Ptc (Patched-1) et COO (Cell adhesion molecule/down-regulates by oncogene) induit une ré-activation de la signalisation apoptotique induite par ces récepteurs. Ainsi l'interférence avec le ligand Shh devrait permettre d'induire une régression tumorale.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Il a été montré que de nombreux types de cancers présentent une sur-expression du ligand Shh, ligand qui favorise la progression tumorale par son action positive sur la prolifération ainsi que son action négative en bloquant la mort induite par Ptc et COO.

Cette étude devrait donc confirmer in vivo notre hypothèse que la privation de Shh pourrait avoir un effet anti-tumoral mais également permettra de mieux comprendre les mécanismes de cet effet; ceci devrait donc conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ayant une efficacité sur divers types de cancers.

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

-Nos composés anti-tumoraux ont été testés tout d'abord in vitro de même que la réponse de différentes lignées modifiées génétiquement de façon stable; seul un modèle in vivo relevant tel que le modèle de xénogreffes en souris Nude peut démontrer l'efficacité de nos composés anti-tumoraux dans un organisme

-Pour tester l'efficacité anti-tumorale d'un composé sur un modèle approchant au plus la tumorigenèse humaine, l'animal de référence est la souris immunodéficiente sur laquelle on pratique des xénogreffes de cellules tumorales d'origine humaine. Ces xénogreffes étant sous-cutanées, cela permet de suivre le développement tumoral sans être invasif en mesurant simplement le volume tumoral externe/accessible.

- Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats et tient compte du pourcentage de prise tumorale qui n'atteint pas 100% pour toutes les lignées utilisées. Une

définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée (absence de signe évoquant une souffrance, taille des tumeurs sous-cutanées < 17 mm).

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation au maximum de 600 souris Swiss nude (N=15/groupe, 9 lignées cellulaires différentes traitées ou non avec un ou deux composés anti-tumoraux - tenant compte d'une prise tumorale de 50% pour certaines lignées).

872- 1-Objectif scientifique du projet

La chimiothérapie anticancéreuse échoue parfois avec l'apparition de résistance. Les transporteurs ABC (A TP Binding Cassette) jouent un rôle majeur dans certains cas. En effet, en évacuant les médicaments de la cellule, ils empêchent leur accumulation et réduisent dramatiquement leur efficacité. ABCG2 fait partie de cette famille de protéines et est responsable de la résistance à différents anticancéreux tels que l'irinotécan ou la mitoxantrone.

Le MBL-II-141 est un inhibiteur d'ABCG2 qui bloque le transport des anticancéreux. In vitro, il rétablit l'accumulation des médicaments dans la cellule pour induire la mort.

Nous avons commencé à caractériser l'efficacité de ce MBL-II-141 chez la souris immunodéprimée. Après injection de cellules tumorales exprimant fortement ABCG2, 8 souris sur 10 ont développé une tumeur malgré une chimiothérapie à base d'irinotécan (transporté par ABCG2). En associant le MBL-II-141 à cette chimiothérapie, seule 1 souris sur 10 a développé une tumeur.

Afin de confirmer l'efficacité du MBL-II-141 sur le développement tumoral, nous souhaitons tester cette molécule sur des tumeurs bien établies (diamètre d'environ 8 mm au départ du traitement). Nous espérons pouvoir observer une régression des tumeurs traitées par l'association de l'inhibiteur et de la chimiothérapie. Afin de mieux caractériser le MBL-II-141, nous souhaitons en parallèle analyser sa métabolisation in vitro (grâce à des extraits actifs de cellules de foies murins) et in vivo (dans les souris).

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Si le MBL-II-141 s'avère aussi efficace sur des tumeurs établies que sur les tumeurs en cours de développement, il pourra être valorisé comme candidat-médicament dans le cadre de poly chimiothérapies traitant certaines récurrences de cancers.

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

L'efficacité du MBL-II-141 dépend de son activité propre (préalablement caractérisée in vitro) mais également de facteurs physiologiques tels que l'accessibilité aux cellules cancéreuses ou sa métabolisation par l'organisme. Afin de prendre en compte, tous ces paramètres pour valider son activité thérapeutique, seul un modèle animal est pertinent.

Le modèle de xénogreffes chez la souris permet d'étudier l'efficacité d'un médicament dans un contexte maîtrisé qui répond au contexte recherché pour notre projet.

Au cours de la procédure expérimentale, les animaux seront surveillés afin que les traitements n'induisent aucune douleur (contrôle du poids, absence de signe de souffrance, diamètre des tumeurs inférieure à 17 mm). Le nombre de groupes d'animaux a été réduit au maximum afin de comporter tous les témoins nécessaires à la validation des résultats. Le nombre d'animaux par groupe a été restreint en tenant compte de la fréquence de prise tumorale après injection des cellules et tout en restant suffisant pour une interprétation statistique des résultats.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Un total de 165 animaux sera utilisé au cours de 3 procédures expérimentales.

873- 1-Objectif scientifique du projet:

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

Nos travaux préliminaires ont également montré la protéine Y n'était pas produite dans le pancréas normal mais était progressivement exprimée dans les lésions pancréatiques précancéreuses et cancéreuses.

L'objectif de ce projet est de tester in vivo l'efficacité du composé X au cours des phases précoces de la transformation tumorale du pancréas exocrine. Pour cela, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées développant des lésions précancéreuses au niveau de leur pancréas.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

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

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

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

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

Seul un modèle murin peut permettre de tester si le composé X peut efficacement ralentir ou inhiber in vivo le développement des lésions précancéreuses pancréatiques et s'il peut favoriser la régression de lésions existantes. Le modèle murin que nous avons choisi pour réaliser cette étude reproduit parfaitement la pathologie humaine puisque c'est l'introduction d'une mutation retrouvée dans plus de 90% des patients atteints de cancer du pancréas qui induit la formation des lésions précancéreuses chez la souris.

Deux procédures expérimentales seront mises en place :

1. Afin de déterminer l'efficacité anti-tumorale du composé X et de montrer l'implication causale de la protéine Y dans la carcinogenèse pancréatique, un premier lot de souris sera traité sur une période de 6 semaines dès le sevrage, c'est-à-dire à un stade où les lésions précancéreuses sont très éparses et de bas grade. Ces souris seront traitées soit avec le composé X (groupe traité), soit avec un composé inerte (groupe placebo). A l'issue de cette période, les souris seront euthanasiées (à l'âge de 9 semaines) et les pancréas prélevés sur les souris de chacun des deux groupes seront comparés.

2. Afin de déterminer l'efficacité anti-tumorale du composé X et de tester son efficacité sur des lésions établies, un deuxième lot de souris sera traité sur une période de 8 semaines à l'âge de 3 mois, c'est-à-dire à un stade où les lésions précancéreuses sont nombreuses et de grade plus élevé. Ces souris seront traitées soit avec le composé X (groupe traité), soit avec un composé inerte (groupe placebo). A l'issue de cette période, les souris seront euthanasiées (à l'âge de 20 semaines) et les pancréas prélevés sur les souris de chacun des deux groupes seront comparés.

Deux facteurs objectifs seront pris en compte afin de déterminer si le traitement est efficace : 1) Le nombre de lésions précancéreuses par unité de surface de pancréas;

2) Les proportions des lésions de chaque grade (grades 1A, 1 B, 2 et 3).

A l'image de ce qui est observé chez l'humain, les lésions précancéreuses pancréatiques qui se développent chez les souris génétiquement modifiées sont microscopiques. Elles sont indolores et n'entraînent aucun signe clinique.

Pour chacun des deux procédures, une expérience « pilote » sera effectuée sur 6 animaux (3 animaux traités et 3 animaux traités placebo). Cette expérience permettra de collecter de précieuses informations concernant i) la mise en œuvre des procédures expérimentales; ii) la tolérance des souris au traitement (dosage et innocuité); iii) l'effet potentiel du composé X.

Suite à l'expérience « pilote », nous réaliserons une expérience « à grande échelle » (10 souris traitées et 10 souris non-traitées) qui permettra l'interprétation statistique des résultats.

Ce projet sera réalisé au sein du Laboratoire des Modèles Tumoraux (LMT) localisé dans notre animalerie. Ceci permettra au projet de bénéficier de toute l'expertise de ce laboratoire dont la mission principale est de mettre en œuvre de tels essais pré cliniques.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, [6 ("pilote" procédure 1) + 20 ("grande échelle" procédure 1)] + [6("pilote" procédure 2) + 20 ("grande échelle" procédure 2)] = 52 souris seront utilisées dans ce projet. Ces souris d'intérêt seront générées par nos soins (élevage nécessitant 1 génération de croisements).

874- Les maladies inflammatoires chroniques intestinales touchent 200 000 personnes en France. Malgré leur fréquence, elles sont largement méconnues. Dans le monde, 2,5 millions de personnes souffrent de MICI. En France, 120 000 personnes sont atteintes de la maladie de Crohn et 80 000 de rectocolite hémorragique. On observe aujourd'hui entre 5 000 et 6 000 nouveaux cas par an. Les MICI sont aussi fréquentes que le diabète insulino-dépendant, deux fois plus fréquentes que la sclérose en plaques et cinq fois plus fréquentes que la spondylarthrite ankylosante.

Il a été démontré chez la souris que l'administration de molécules agonistes du récepteur CB2 entraîne une diminution de l'intensité de la colite. Les récepteurs CB2 sont aujourd'hui une cible thérapeutique reconnue pour le traitement de ces maladies. Nous avons développé une collaboration avec une équipe de chimistes qui découvrent et synthétisent de nouveaux ligands CB2. Notre rôle est de tester si l'administration de ces nouvelles molécules exerce un effet thérapeutique sur le développement de la colite induite par le TNBS et par le DSS chez la souris. L'utilisation de modèles de souris est la seule façon d'obtenir des données solides permettant de mettre en place des études précliniques nécessaires au développement de nouveaux médicaments.

La règle des 3 R sera appliquée de la façon suivante : les expérimentations sont réalisées sur des groupes de 10 souris de façon à atteindre le seuil de significativité pour les molécules efficaces. Comme il est nécessaire pour chaque évaluation d'effectuer un groupe avec colite et le diluant de la molécule à tester, et un groupe avec colite et contrôle positif anti-inflammatoire, ces 2 groupes sont systématiquement associés au nombre maximal de groupes traités qui est de 6, donc chaque évaluation de 6 molécules nécessite 80 souris.

En fonction du nombre de molécules synthétisées par les chimistes et du nombre de molécules qui passent le filtre du test in vitro, nous estimons à 36 le nombre de molécules à tester et donc à 480 le nombre de souris nécessaire. Les molécules qui donnent un résultat positif (supérieur à l'effet du contrôle positif anti-inflammatoire) sont testées dans le second modèle de colite, donc 240 souris supplémentaires seront nécessaires, soit un total nécessaire de 720 souris.

875- Les infections à Escherichia coli productrices de Shiga toxines (STEC) représentent la première cause de syndrome hémolytique et urémique (SHU), un syndrome potentiellement mortel, fréquent chez les enfants infectés et constituant la première cause d'insuffisance rénale chez ces patients. Il n'existe pas de traitement spécifique des infections à STEC. En

particulier, les antibiotiques favorisent la production de toxines de Shiga (Stx) par les STEC et augmentent les risques d'apparition de SHU. Il existe des composés chimiques capables d'inhiber sélectivement le transport rétrograde des toxines de bactéries et de plantes dans les cellules eucaryotes, dont les toxines de Shiga. L'utilisation de ces composés pour protéger les cellules contre les toxines, ainsi que des dérivés optimisés, ont été brevetés. Un composé particulier est capable de protéger des souris contre l'effet mortel d'une toxine de plante, la ricine, dont le mécanisme d'action est similaire à celui des Stx. Un second composé a été obtenu par optimisation du premier composé et est 100 fois plus efficace pour protéger des cellules contre les Stx. Nous proposons d'établir in vivo la preuve de concept de ces 2 molécules pour traiter les infections à STEC dans un modèle souris Balb/C. En particulier, nous proposons ces molécules pour prévenir l'apparition du SHU. Les infections à STEC, l'induction et le relargage des toxines Stx ainsi que la mise en place du SHU sont des phénomènes très complexes faisant intervenir des facteurs bactériens, environnementaux ainsi qu'une réponse de différents types cellulaires de l'hôte. Ils ne peuvent être correctement modélisés in vitro. Le recours à un modèle animal, ici souris, est indispensable. En raison des variabilités de réponse parfois assez importantes dans les modèles expérimentaux d'infection chez la souris et afin d'obtenir des résultats statistiquement robustes pour les deux composés testés qui pourront servir de données précliniques, nous planifions d'utiliser 134 souris Balb/C. Le modèle consiste à infecter oralement des souris, préalablement traitées à la streptomycine, avec des souches STEC, puis à induire la production de la toxine et le SHU par injection de mitomycine C. Le traitement avec les inhibiteurs a lieu dès la fin de l'induction de la toxémie. Un suivi clinique des animaux est ensuite réalisé pendant 10 jours. Cette étude a pour objectif ultime d'engager le développement industriel d'un médicament contre les STEC et le SHU par un transfert de technologie vers une société pharmaceutique.

876- Les nanoparticules se définissent comme des éléments dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm dans au moins deux des trois dimensions de l'espace. Leur petite taille entraîne un rapport surface sur volume très important, ce qui leur confère des propriétés nouvelles par rapport aux structures microscopiques. Les nanoparticules sont soit environnementales avec des niveaux variant de quelques milliers à quelques dizaines de milliers de nanoparticules par cm³ d'air, soit manufacturées, leur production étant alors intentionnelle pour des applications à visée de recherche ou industrielle. Cependant quelle que soit leur origine, la toxicité des nanoparticules et leur impact sur la santé restent encore mal compris. Les niveaux d'exposition aux nanoparticules manufacturées sont actuellement peu connus et les milieux professionnels de production industrielle pourraient être les plus concernés. L'essor des nanotechnologies soulève donc de plus en plus d'inquiétudes quant au risque potentiel que représentent les nanoparticules pour la santé, d'autant plus que la peur suscitée par la crise de l'amiante reste présente.

Si plusieurs études ont mis en évidence une toxicité des nanoparticules au niveau de l'appareil respiratoire, elles sont moins nombreuses à avoir étudié leur toxicité potentielle sur d'autres organes, en particulier leur reprotoxicité. Il est donc légitime de s'interroger sur une toxicité testiculaire potentielle des nanoparticules. Toutefois, si les études sur modèles cellulaires réussissent à observer les nanoparticules par des techniques de microscopie électronique à transmission, les études sur modèle animal sont toutes confrontées au même écueil : du fait de leur petite taille, les nanoparticules sont très difficiles à observer avec les techniques de microscopie conventionnelle, particulièrement lorsqu'elles se trouvent au sein de matrices biologiques complexes. Ainsi, les études sur modèle animal font exclusivement appel à des techniques de détection globales des nanoparticules (ICP-MS, spectrométrie gamma) qui ne permettent pas d'observer leur distribution au sein du testicule ou d'évaluer leur toxicité locale directe.

Des travaux préliminaires conduits au sein de notre équipe ont montré que des particules modèles fluorescentes de grande taille (450nm) injectées à des souris par voie intramusculaire étaient capables d'atteindre le testicule et nous avons pu définir leur répartition intra-testiculaire. Toutefois, ce modèle ne rentre pas dans la définition actuellement acceptée des nanoparticules. Il est donc difficile d'extrapoler l'impact que pourraient avoir les nanoparticules environnementales sur la fonction testiculaire à partir de ces résultats. Ainsi nous souhaitons optimiser nos méthodes d'observation in situ (microscopie confocale multiphotonique, microscopie Raman et microscopie électronique haute résolution) sur des particules de caractéristiques physico-chimiques contrôlées et de taille inférieure à 100 nm. Cette optimisation, qui se fera dans un premier temps sur des testicules de souris après injection intramusculaire de nanoparticules, ouvrira de nombreuses perspectives pour la détection et l'évaluation de la toxicité des nanoparticules au sein d'autres organes. Cette étude sera menée en adéquation avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement définies dans la directive 2010/63/UE : le nombre d'animaux utilisés est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. 3 animaux par groupe (6 groupes) soit 18 souris. Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats, il permet de réaliser toutes les analyses de cette étude préliminaire afin de déterminer si les nanoparticules atteignent le testicule.

877- 1- Objectif scientifique du projet

L'objectif de ce projet est d'étudier in vivo dans des modèles précliniques murins de tumeurs mammaires surexprimant l'oncogène HER2/Neu, l'activité antitumorale de nouvelles stratégies thérapeutiques induisant la mort des cellules tumorales en ciblant l'oncogène HER2/Neu à une stimulation du système immunitaire. Des ligands des récepteurs Toli (TLR-L) mimant un signal de danger

viral ou bactérien seront utilisés pour activer les cellules dendritiques associées aux tumeurs (TADC). Le but de cette stratégie thérapeutique est de libérer des antigènes tumoraux au cours de l'apoptose et de restaurer la capacité des TADC à les capturer et les présenter aux lymphocytes T effecteurs de l'immunité antitumorale.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le traitement du cancer du sein métastatique HER2/Neu amplifié reste un problème de santé publique.

Les approches de thérapies ciblées sur HER2/Neu ont l'avantage de ne pas être cytotoxiques pour le système immunitaire mais nécessitent un traitement à vie des patientes et conduisent fréquemment au développement de mécanismes de résistance. D'où notre hypothèse qu'une combinaison avec une immuno-intervention réactivant les TADC permettrait de détruire les cellules résiduelles par les effecteurs du système immunitaire et d'obtenir des rémissions totales.

3- Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

L'évaluation préclinique de nouvelles approches thérapeutiques dans des modèles de tumeurs établis chez la souris est indispensable avant la réalisation d'étude de phase 1 chez l'homme. Nous avons développé des modèles de tumeurs mammaires chez la souris présentant des caractéristiques communes avec les tumeurs humaines (surexpression de l'oncogène HER2/Neu, infiltrat immunitaire immunosuppresseur). La sensibilité des lignées tumorales mammaires aux thérapies ciblées a été préalablement validée in vitro. Le nombre de souris utilisées dans les procédures expérimentales associées à ce projet sont réduits au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables (N=10/Groupe et reproduction de l'expérience IX). Les points limites sont fixés afin de réduire au maximum la souffrance des animaux qui est évaluée à un degré de gravité modéré (taille de tumeur <17mm, absence de nécrose, absence de signe généraux évocateurs de mal être: prostration, poils hérissés, dyspnée).

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet: 1780 souris

878- Les anticorps IgA constituent la sous-classe d'immunoglobuline la plus abondante dans l'organisme et une des caractéristiques principales de la réponse immunitaire muqueuse. Associée à la suppression des réponses T pro-inflammatoires (phénomène de tolérance orale), la sécrétion d'IgA joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale en permettant le maintien de la flore commensale et la neutralisation des agents pathogène. L'activation/expansion des LB, la commutation isotypique vers IgA et la différenciation en plasmocytes (PC) est initiée principalement dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou GAL T (Plaques de Peyer, MLN) et met en jeu des sous-populations de OC et des facteurs (cytokines immunosuppressives comme IL 10 et TGF β , acide rétinoïque) impliqués également dans la tolérance orale. Capitalisant sur des données assez anciennes de la littérature et nos résultats récents, nous formulons l'hypothèse que, à l'instar de son rôle dans la tolérance orale, le foie est susceptible de constituer un site important d'induction et/ou d'amplification de la réponse IgA muqueuse, à la fois vis-à-vis d'Ag d'origine intestinale (portés par la flore intestinale ou par des pathogènes) et d'Ag véhiculés par le sang et rejoignant le foie via l'artère hépatique. Nous avons en particulier démontré chez la souris que le foie est particulièrement enrichi en OC plasmacytoïdes (pDC), qui sont responsables de la délétion des L T CDS+ suite à l'administration orale d'un Ag et dont le rôle essentiel dans l'induction de PC à IgA dans les MLN et les plaques de Peyer vient d'être démontré. Par ailleurs, plusieurs groupes ont montré qu'une immunisation orale ou systémique avec un Ag bactérien ou des globules rouges conduit à une augmentation massive de la proportion de LB et à l'apparition de PC sécrétant des IgA spécifiques dans le foie, qui précède le relargage d'IgA dans la bile. L'objectif du projet visera à caractériser les mécanismes biologiques à l'origine de cette réponse IgA hépatique en déterminant en particulier si le foie constitue un site de différenciation et/ou de homing des PC.

Cette étude devrait permettre d'éclaircir les mécanismes fondamentaux liés à la présence d'une réponse à IgA au niveau du foie à l'état d'homéostasie, et d'en comprendre l'impact sur la protection intestinale. Les informations recueillies devraient être d'un intérêt majeur pour la recherche de voies et de méthodes de vaccination efficaces pour produire une réponse IgA capable de protéger contre des agents infectieux, au niveau des muqueuses et au niveau systémique. La procédure expérimentale décrite ci-dessous ne devrait pas entraîner de souffrance pour les animaux, et le nombre total de souris (40 animaux, 20 par procédure, répétée une fois) a été fixé a minima afin de permettre une interprétation statistique des résultats.

879- Les nanoparticules à base de gadolinium développées au laboratoire ont démontré un potentiel en tant qu'agent diagnostique (imagerie) et radiosensibilisant (augmentation de l'effet de la radiothérapie localement). Cet effet permet d'envisager leur transfert en clinique. Toutefois, si les différentes études de biodistributions des nanoparticules ont révélé une élimination rénale de la particule, elles ont également mis en avant la persistance dans une zone du rein de 25-30% de la dose injectée qui perdure et s'élimine lentement en 14 jours environ après l'injection unique. Il semble plus que pertinent de mettre au point une méthode permettant de réduire ou d'empêcher cette accumulation afin d'optimiser l'utilisation des nanoparticules (imagerie dans la zone rénale, thérapie dans cette zone, élimination complète et rapide des particules par l'urine).

Une étude parallèle a montré le rôle majeur du tubule contourné distal dans cette rétention, alors que l'accumulation dans le tubule contourné proximal est beaucoup plus faible.

Aussi nous souhaitons administrer des diurétiques spécifiques du tubule contourné distal afin de faciliter l'élimination des nanoparticules et ainsi de préserver la fonction rénale. Le protocole choisi est calqué à la fois sur des posologies décrites chez la souris dans la littérature et sur les protocoles transposables à l'homme.

Au minimum, 18 souris sont prévues dans cette première partie expérience et au maximum, 60 souris seront utilisées. Si la première expérience détaillée ici est efficace, le protocole sera arrêté; dans le cas contraire, 40 autres souris pourraient être utilisées.

Une réduction majeure de l'accumulation rénale renforcerait les critères en faveur de l'administration des nanoparticules en tant que radiosensibilisateur chez l'homme

880- Les nanoparticules à base de gadolinium développées au laboratoire ont démontré un potentiel en tant qu'agent diagnostique (imagerie) et radiosensibilisant (augmentation de l'effet de la radiothérapie localement). Cet effet permet d'envisager leur transfert en clinique.

Les études de radiosensibilisation nous ont conduit à utiliser une dose en injection unique de 2001-11 à 40mM minimum. Lors de traitements répétés, la dose peut être administrée chaque semaine lors de la durée de la radiothérapie (2 semaines au maximum). Afin de connaître la tolérance de ces nanoparticules (NP) chez la souris, il est nécessaire de conduire une étude de dose maximale tolérée (DMT) en vue de déterminer les doses thérapeutiques transférables à l'homme.

Lors de ce protocole, la dose administrée augmente groupe par groupe jusqu'à un point limite prédéfini (au maximum 10 fois la dose habituelle administrée). Les animaux sont suivis régulièrement et à la fin de l'expérience après sacrifice des animaux, les organes et liquides physiologiques sont prélevés et analysés (dose de la quantité de NP restante, immunomarquage de tissu etc).

881- Ce protocole de phénotypage vise à caractériser les conséquences majeures de l'effet d'une mutation génétique sur les fonctions physiologiques principales. Le but étant de déterminer de manière rapide et efficace les impacts potentiels de la mutation et d'orienter les études suivantes sur des cibles d'intérêt ou encore de mettre un terme au projet. Ce protocole implique des tests simples et des observations des animaux. Il pourra s'appliquer à différentes souris génétiquement modifiées dont la caractérisation n'a pas été effectuée. Dans le cas d'une mutation induite, une série d'injection de tamoxifène pourra être menée en début de protocole. L'avantage de ce protocole réside dans sa capacité à fournir un corpus d'information suffisant pour prendre une décision quant à l'utilisation de la lignée pour des projets ultérieurs. Un nombre limité de tests est défini ainsi que le nombre suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique suffisante. Selon le type de mutation, 32 à 48 animaux par lignée seront donc utilisés, afin de disposer de l'ensemble des contrôles nécessaires à la bonne interprétation des résultats. Un maximum de 20 lignées sera étudié par an en suivant ce protocole, soit un effectif maximal de 2900 souris sur les 3 ans de ce projet. Ce protocole respecte ainsi les exigences de raffinement, de réduction. Tous les tests étant nécessaires et suffisants à la prise de décision.

882- L'infection chronique par certaines souches de *Helicobacter pylori* est responsable du développement d'une inflammation chronique de la muqueuse gastrique, pouvant évoluer chez l'Homme dans 5 à 10% des cas vers le développement d'ulcères gastro-duodénaux. Certains produits naturels ont la capacité d'inhiber in vitro la croissance de *H. pylori* et/ou permettent de diminuer l'adhérence de cette bactérie aux cellules épithéliales gastriques, permettant d'envisager leur utilisation pour un effet protecteur de l'infection/inflammation chez l'homme.

Halocynthia roretzi qui pousse en Extrême Orient produit des sucres qui ont une analogie structurale avec les terminaisons glucidiques de *H. pylori* responsables de l'adhérence de cette bactérie aux cellules épithéliales gastriques. Des modifications structurales de ces sucres ont été réalisées pour améliorer ces propriétés montrées in vitro et un brevet incluant l'Université Bordeaux Segalen est en cours de dépôt.

Saccharomyces boulardii est utilisé depuis longtemps en complément de traitement des diarrhées aiguës d'origine infectieuse. Des études récentes indiquent un rôle potentiel de *S. boulardii* dans l'amélioration des taux d'éradication après traitement de l'infection à *H. pylori*. Son rôle sur l'adhérence bactérienne a été étudié in vitro.

Cette étude a pour but de confirmer le rôle de *S. boulardii* et des sucres de *H. roretzi* dans un modèle in vivo. Pour cela, nous proposons d'utiliser notre modèle murin d'infection chronique par *H. pylori*, afin d'étudier l'impact du traitement chronique par *S. boulardii* et les sucres de *H. roretzi* sur la colonisation bactérienne et sur le développement d'une inflammation locale de la muqueuse gastrique.

Le protocole utilisera un groupe expérimental de 100 souris C57Bl/6 femelles. Les souris seront achetées à 4 semaines, puis après 1 semaine de quarantaine et une semaine d'acclimatation en animalerie A2 de notre université, les animaux seront inoculés par *H. pylori* SS1 à l'âge de 6-7 semaines et traités par les 2 composés en préventif, continu ou curatif. Dans le respect de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) :

- réduire et raffiner : nous avons déterminé le nombre d'animaux en fonction : 1/ d'études précédentes réalisées avec cette souche *H. pylori* SS1, qui n'engendrent pas de problèmes particuliers ni de mortalité spontanée dans cette cinétique, et 2/ du nombre minimal nécessaire pour interpréter les résultats de culture, biologie moléculaire ou d'histologie (10 souris par groupe traité et 5 souris par groupe témoin non infecté non traité) et réaliser une étude statistique. Les souris utilisées sont des femelles, ce qui permet de les garder à long terme sans problèmes de dominance

comme cela peut être parfois rencontré avec les males. Le projet comporte 2 composés à étudier : S. boulardii et H. roretzi. Le regroupement de ces 2 études en une seule permet de réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes groupes témoins positifs (infecté par SS1) et négatif (non infecté non traité) pour les 2 projets.

- remplacer : l'infection par H. pylori induit une colonisation de la muqueuse gastrique qui persiste tout au long de la vie et une réponse inflammatoire complexe, évoluant au cours du temps (de aigue à chronique), qui ne peut être reproduite par des cultures cellulaires. De plus nous cherchons à confirmer in vivo des résultats encourageants.

883- L'angiogenèse est un processus permettant la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux pré-existants. En physiologie, l'angiogenèse est très importante lors du développement embryonnaire ou lors de processus de cicatrisation. Des altérations du processus angiogénique jouent également un rôle dans certaines pathologies. Ainsi, un excès d'angiogenèse joue un rôle dans la croissance tumorale, ainsi que dans la dissémination des cellules cancéreuses permettant la formation de métastases. A l'inverse, un défaut d'angiogenèse peut avoir des conséquences très graves lors de pathologies ischémiques telles que l'infarctus du myocarde, l'ischémie de membres inférieurs ou encore les accidents vasculaires cérébraux. En effet, un défaut d'angiogenèse va limiter le processus de revascularisation nécessaire à la récupération d'une fonction normale chez ces patients.

L'angiogenèse apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante.

L'objectif de ce projet est de caractériser le potentiel pro-angiogénique ou anti-angiogénique de microparticules membranaires isolées à partir du sérum de patients souffrant de syndrome métabolique et qui ont été testées préalablement sur un modèle d'angiogenèse in vitro. Les microparticules sont des microvésicules libérées par les cellules en réponse à diverses stimulations (physiques ou chimiques) ou lors de l'apoptose. Elles ont été identifiées comme des biomarqueurs et bioeffecteurs dans le cadre du syndrome métabolique et notamment au niveau de la régulation de la fonction vasculaire. Afin de caractériser l'effet de ces microparticules sur l'angiogenèse in vivo, nous utiliserons un système de greffe (en sous-cutané) d'une matrice extracellulaire appelée ECMgel®, qui permet de créer un environnement favorable à la formation de vaisseaux sanguins. Le ECMgel® sera injecté en présence de cellules humaines préalablement stimulées in vitro avec les microparticules. Le ECMgel® contenant des cellules humaines et les microparticules utilisées étant d'origine humaine, des souris de type Nude seront utilisées afin d'éviter toute réaction immunitaire. Pour cette étude, 72 animaux seront nécessaires (6 souris X 12 conditions d'injection).

Les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés. L'injection sous-cutanée de ECMgel® a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Une telle étude nous permettra de caractériser d'avantage le rôle des microparticules dans la physiopathologie du syndrome métabolique et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

884- 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. Des augmentations éventuelles de la production laitière et du taux butyreux du lait ne sont possibles que s'il existe de fortes modifications du métabolisme lipidique. Ainsi, ce dernier peut être quantifié par les mesures d'ingestion des aliments et de la production laitière.

Des modifications du métabolisme lipidique peuvent être évaluées par la détermination du profil métabolique et hormonal (notamment l'insulinémie) au niveau sanguin. Le métabolisme lipidique dépend aussi fortement du métabolisme mammaire. C'est pourquoi des mesures de l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse mammaire et l'analyse de la composition en acides gras du lait seront effectuées.

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.

885- Analyse des effets protecteurs de nouveaux composés contre la toxicité amyloïde (déficits de mémoire induits) dans un modèle non-transgénique de la maladie d'Alzheimer. Prestation de Service pour l'industrie.
Les composés (codés pour raison de confidentialité) seront injectés à différentes doses par voie orale chez des souris développant une maladie de type Alzheimer.

886- Les stents actifs de première génération n'ont pas démontré de diminution de la morbi-mortalité au long cours, comparativement aux stents nus, du fait d'un risque accru de thrombose aigue tardive. Actuellement, ils imposent le recours à une double anti-agrégation au long cours, souvent délétère. Ce risque s'explique par un retard de cicatrisation et de réendothélialisation des mailles, entraînés par les drogues utilisées, et des phénomènes d'hypersensibilité liés aux polymères non résorbables délivrant ces drogues.

Au sein de notre laboratoire, des travaux ont été préalablement conduits sur deux molécules thérapeutiques, administrées par voie générale chez l'animal :

- l'hémine, un inducteur de l'hème oxygénase-I, avec laquelle nous avons démontré in vivo, une diminution significative de la resténose, tout en améliorant la cicatrisation et la ré-endothélialisation;

- un nouvel anti-thrombotique, EP224283, combinant un anti-facteur Xa (l'idraparinux) avec un antiplaquettaire antiGP2b3a (le tirofiban), avec lequel nous avons démontré une réduction de la resténose ainsi qu'une réduction de l'agrégation plaquettaire au contact du stent.

L'hypothèse fondant ce travail est que l'administration locale d'hémine ou de EP224283 via un stent, modifié ou non-modifié, par un polymère biodégradable, permettrait de diminuer considérablement les phénomènes de resténose, tout en limitant le risque de thrombose aigue tardive.

C'est ce qui fait l'objet de ce projet : utiliser les modèles établis de resténose chez le rat (Wistar, male, 300-400 g) et le lapin (New Zealand White, male, 3.5-4 Kg) comme une nouvelle plate-forme pour évaluer les cibles et les stratégies de prévention de la resténose, notamment par les stents actifs.

887- La définition de stratégies thérapeutiques permettant de réduire la neurodégénérescence est un défi majeur pour la recherche contre la maladie de Parkinson, A l'aide d'un modèle de souris transgéniques modélisant les stades précoces de la maladie de Parkinson, nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique de composés pharmacologiques pour leur capacité à diminuer l'accumulation de la protéine alpha-synucléine associée à la mort neuronale dans la maladie de Parkinson, Nous espérons identifier des composés capables de diminuer l'accumulation d'alpha-synucléine, la mort neuronale et les altérations cognitives et motrices dans notre modèle, Les composés prometteurs pourront par la suite être évalués pour une utilisation chez l'Homme, étant donné le vieillissement de notre population et le coût humain et économique de la maladie de Parkinson, ce projet est de la plus haute importance pour notre société.

888- Les cils primaires, présents dans de nombreuses cellules de notre organisme, permettent de traduire des stimuli mécaniques ou chimiques qui sont transmis aux cellules depuis l'extérieur en une réponse intracellulaire contrôlant par exemple le cycle ou la polarité cellulaire. Des cils défectueux sont tenus pour responsables de nombreuses maladies héréditaires classées dans la catégorie « ciliopathies ». De nombreuses ciliopathies sont des maladies de la rétine. Ces maladies, telles que les syndromes d'Usher et de Bardet-Biedl et la rétinite pigmentaire conduisent souvent à un rétrécissement du champ visuel, à des défauts de la vision nocturne puis à une dégénérescence de la rétine.

Dans notre équipe, nous nous intéressons au rôle de la protéine EFA6, dont nous avons montré l'implication dans la fonction de barrière dans des cellules épithéliales rénales. Très récemment, nous avons observé qu'un changement de son niveau d'expression dans des cellules en culture, issues de l'épithélium pigmentaire rétinien, affectait la ciliogenèse. Peu de protéines sont actuellement connues pour être impliquées dans la formation du cil. Notre hypothèse de travail est que la protéine

EFA6, de par son rôle sur la formation du cil primaire dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, pourrait être impliquée dans les mécanismes de la vision. Notre 1^{er} projet pourrait non seulement nous apporter des renseignements sur l'interaction entre les segments externes des photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien mais également nous apporter une meilleure compréhension des maladies rétiniennes résultant d'un défaut de ciliogenèse.

Jusqu'alors nous avons substitué les animaux par des cultures de cellules de rétines.

Cette étude in vitro nous a permis de comprendre le rôle de notre protéine d'intérêt dans la formation du cil primaire et dans l'établissement de la polarité épithéliale. Mais les lignées cellulaires ne peuvent nous renseigner sur son rôle dans le mécanisme de la vision. Ainsi l'aboutissement de notre projet nécessite à présent l'utilisation de modèle animal. Nous prendrons soin d'utiliser un nombre minimum d'animaux que nous estimons à moins de quatre-vingt. Ce nombre ne peut être inférieur car il tient compte des animaux « contrôles » et des besoins de reproductibilité. La souris sera choisie comme modèle d'étude car les techniques d'analyse de la fonction rétinienne y sont extrêmement bien validées.

Enfin le sacrifice de cette quatre-vingtaine de souris devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle du cil primaire des cellules rétiniennes dans la vision et de mieux appréhender chez l'homme les maladies graves que sont les ciliopathies affectant la rétine.

889- Dans le cadre de la thérapie génique, nous cherchons à optimiser la délivrance d'acides nucléiques codant des gènes d'intérêt thérapeutique à l'aide de vecteurs synthétiques. Afin de cibler le maximum de muscles de la patte en un seul acte chirurgical, l'injection par la veine saphène appelée Hydrodynamic Limb vein HLV procedure est la mieux indiquée. Cette technique décrite dans plusieurs publications au cours des dernières années a été mise en œuvre dans des essais thérapeutiques chez la souris et chez l'homme. Elle permet de cibler les muscles superficiels et profonds de l'ensemble de la patte. Dans un premier temps, les vecteurs seront testés et les conditions d'emploi optimales mises au point à l'aide de 5 souris swiss par conditions. La deuxième étape consiste à confirmer ces données dans un but thérapeutique chez un modèle animal tels que la souris mdx dans le cadre de la myopathie de Duchenne. L'injection n'entraînant pas de problèmes musculaires ou moteurs chez la souris nous pourrions étudier son impact thérapeutique. L'usage d'un modèle in vivo à ce niveau de notre recherche est indispensable afin d'évaluer le comportement de nos vecteurs synthétiques lors d'une injection dans le système sanguin. Ce milieu tant par sa mécanique que par sa composition peut entraîner des modifications de comportement que l'on ne peut évaluer in vitro. La mise en place de ce projet répondra à de nombreuses questions avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme.

890- Les neurones dopaminergiques (DA) de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et de la substantia nigra pars compacta (SNc) jouent un rôle majeur dans les comportements orientés vers une récompense. Les drogues les détournent de leur fonction endogène et aboutissent à la prise compulsive de celles-ci. Les neurones DA sont régulés par des récepteurs nicotiques (nAChR), qui sont largement exprimés dans le cerveau. Leurs diverses sous-unités aux propriétés différentes influencent la libération de neurotransmetteurs, l'excitabilité et la plasticité du cerveau. Les neurones DA sont impliqués dans des maladies mentales (Parkinson, Huntington, Alzheimer) pour lesquelles la recherche pharmaceutique travaille sur des traitements visant les nAChR. Les expériences que nous menons ont pour objectif de détailler les processus de contrôle endogènes et exercés par les drogues sur l'activité des neurones dopaminergiques.

891- La formation des étudiants (de Licence à Master 2) en Biologie et plus particulièrement en Physiologie nécessite que ceux-ci acquièrent un minimum d'expérience dans le domaine de la manipulation des animaux vivants et la réalisation de manipulations courantes qu'ils seront amenés à reproduire ultérieurement dans leur carrière (techniciens en Biologie, ingénieurs ou chercheurs). Ils doivent ainsi apprendre à anesthésier correctement des animaux, injecter des substances pharmacologiques, recueillir des paramètres physiologiques, afin d'appliquer la théorie de leurs enseignements en pratiquant sur l'animal. Différentes séances de Travaux Pratiques sur animaux vivants (rats), anesthésiés et analgésiés, sont réalisées afin d'étudier les variations de plusieurs paramètres physiologiques tels que le rythme cardiaque, la pression artérielle... elles relèvent de procédures sans réveil (Art 214-122). Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R (détaillé aux points 3 et 4.) Les séances de travaux pratiques seront détaillées au point 3.3.2. Par année, 190 rats sont commandés en TP de L3, soit sur la durée totale du projet de 5 ans 950 rats seront utilisés.

892- Dans le cadre du projet européen REBORNE, nous effectuons des recherches en régénération tissulaire osseuse à partir de cellules souches mésenchymateuses et de biomatériaux. Le projet REBORNE vise 5 essais cliniques en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale (www.rebome.org).

Le but de l'étude est d'étudier l'apport de l'ingénierie tissulaire pour le traitement de l'ostéonécrose aseptique de la tête fémorale. L'implantation d'un mélange extemporané de cellules souches humaines et des particules de céramiques en site ectopique sous cutané chez la souris Nude, nous a permis de mettre en évidence la formation d'un tissu osseux. Nous souhaitons maintenant vérifier ce potentiel ostéoinducteur sur un site d'ostéonécrose. La première phase du projet consiste à développer un modèle chirurgical fiable d'ostéonécrose de la tête fémorale chez le rat. Il consiste, par une incision cutanée de 3cm, en la réalisation d'un abord antérieur du col fémoral par dissection sans section musculaire, puis induction d'une nécrose de tête par dévascularisation et électrocoagulation du col fémoral. Les 2 hanches seront utilisées. Après induction de l'ostéonécrose de la tête fémorale, les rats seront réopérés 14 jours plus tard : après forage trans-cervical, une hanche recevra une injection de cellules souches mésenchymateuses humaines ou une injection de moelle osseuse concentrée humaine et la 2ème servira de groupe témoin pour contrôler l'évolution naturelle de l'ostéonécrose. Après 8 semaines, les animaux seront euthanasiés et les têtes fémorales prélevées seront fixées, décalcifiées, déshydratées et incluses dans la paraffine afin de réaliser une analyse histologique. L'analyse histomorphométrique des têtes fémorales sera réalisée avec un logiciel pour déterminer la qualité de la repousse osseuse. Les résultats de régénération osseuse pourront alors être comparés. Les rats Nude sont essentiels pour cette étude car ils rendent possible l'utilisation de cellules souches ou de moelle osseuse humaines. Par ailleurs, pour chacun des rats les 2 hanches peuvent être utilisées, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires à une analyse statistique satisfaisante des résultats. Le nombre de rats nécessaire à l'expérimentation est de 20.

Il n'existe pas, à notre connaissance, de modèle d'ostéonécrose post-chirurgicale validé chez le rat. La comparaison de l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses humaines et de moelle osseuse concentrée humaine n'a jamais été publiée à notre connaissance.

893- Les multi-expositions sont nombreuses en milieu professionnel et il n'est pas rare que bruit et agents chimiques coexistent sur le lieu de travail. Les agents sont si nombreux qu'il semble irréaliste de tous les tester dans le cadre d'une co-exposition avec le bruit.

Dans cette étude, nous essayerons d'élaborer un modèle expérimental, chez le rat, pour évaluer l'impact neuropharmacologique d'un solvant sur le déclenchement du réflexe de l'oreille moyenne (ROM). Ce dernier nécessite le fonctionnement physiologique du récepteur auditif périphérique (la cochlée), des voies auditives afférentes, efférentes, des centres nerveux et enfin d'un effecteur (muscles de l'oreille moyenne). Une telle étude ne peut donc être réalisée avec une approche in vitro.

L'objectif sera, in fine, de mettre au point un test de screening capable d'évaluer les risques pour l'audition d'une co-exposition « bruit - agent chimique ».

Les molécules pressenties dans cette étude sont le benzène, le toluène, le styrène, les xylènes (o-, m- & p-) et le n-butylbenzène. Le modèle reposera sur la relation entre l'amplitude du ROM et le coefficient de partage [$\text{LogP} = \text{LogKow} = \text{Log}(\text{Coct}/\text{Ceau})$] des solvants, ce dernier permettant d'apprécier le caractère lipophile d'une molécule. Cette relation pourrait avoir la forme suivante:

variations d'amplitude du ROM = f (LogKow) des solvants.

Ensuite, la pertinence du modèle sera évaluée avec des substances dont on connaît le log Kow sans en connaître les effets ototoxiques (solvants chlorés par exemple). Le modèle nous permettra donc de trier les molécules en fonction de leur action sur le ROM et par là-même de prioriser les études relatives aux risques encourus par des sujets co-exposés à des substances et à du bruit.

Cette approche est rapide (1/2 journée), elle présente l'avantage d'expérimenter sur des animaux anesthésiés et, à l'avenir, d'en réduire le nombre en sélectionnant les molécules les plus efficaces.

894- L'augmentation croissante du diabète et pathologies associées dans le monde en fait désormais un problème de santé publique nécessitant l'amélioration de la qualité des soins, la prise en charge thérapeutique et la maîtrise des coûts de traitement.

La formation d'ulcère au niveau du pied des patients diabétiques représente la première cause d'amputation dans le monde, et les frais engendrés de prise en charge et traitement avant amputation sont en constante augmentation. Il n'existe à ce jour pas de traitement actif proposé sur le marché européen.

Notre société développe une plateforme innovante d'excipients pharmaceutiques permettant entre autre d'améliorer la biodisponibilité, la solubilité et la stabilité de protéines thérapeutiques recombinantes humaines. L'association d'un nouvel excipient à une de ces protéines sous forme de solution représente une réelle innovation et avancée thérapeutique dans la prise en charge des plaies chroniques.

Dans notre projet, nous souhaitons déterminer la pharmacocinétique de nos produits, puis démontrer leur efficacité et leur innocuité. Pour cela, nous allons réaliser des prélèvements sanguins sur des rats qui permettront d'analyser les concentrations plasmatiques de nos produits.

Le développement d'un produit par voie topique impose également l'évaluation de la tolérance locale sur peau saine et peau lésée chez l'animal avant toute utilisation chez l'homme. Nous allons donc utiliser des modèles de plaies sur rongeurs, décrits dans la littérature, représentatifs de la pathologie humaine avec ses composantes vasculaires et neurologiques, identiques à ceux utilisés par la seule société pharmaceutique ayant développé un traitement approuvé aux Etats-Unis pour l'ulcère du pied diabétique neuropathique.

Toutes ces données sont essentielles au développement de nos nouveaux excipients et aucun modèle in vitro ne peut se substituer à l'utilisation de modèles animaux, que ce soit dans le cadre d'étude de pharmacocinétique ou d'évaluation du risque toxicologique. Aucune méthode alternative ne permet non plus actuellement de reproduire la diffusion des produits à développer à partir d'une plaie dans le sang des animaux. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ces produits.

2 procédures expérimentales sont donc prévues dans ce projet. Seuls des rats seront utilisés et leur nombre par étude a été réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet: au total, en 5 ans, au maximum 1500 rats provenant d'élevage agréés seront utilisés. Ce nombre pourra éventuellement être réduit si les résultats préliminaires le permettent.

Afin de réaliser les procédures dans le plus grand respect de l'éthique animale, les actes techniques seront réalisés par des personnes formées et compétentes. Les prélèvements sanguins seront réalisés en nombre limité et toujours sous anesthésie générale. Les chirurgies nécessaires au modèle de plaies seront toujours réalisées sous anesthésie générale et avec des traitements analgésiques adaptés et continus.

895- L'athérosclérose est une cause majeure de décès dans le monde. En France, les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité (environ 38% des décès). Une des complications majeures de l'athérosclérose associées à l'infarctus du myocarde, aux accidents vasculaires cérébraux et bien souvent au décès, consiste en la rupture de plaques d'athérome et la formation de thrombus. La compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans ces complications symptomatiques est donc capitale afin d'envisager de nouvelles cibles pharmacologiques plus efficaces. L'athérosclérose est associée à un remodelage matriciel accru et une altération de la

structure et de la fonction des vaisseaux dans lesquels les fibres élastiques sont dégradées et de larges quantités de peptides d'élastine sont produites. De nombreuses données de la littérature suggèrent que les peptides d'élastine ainsi produits pourraient avoir des effets délétères sur le développement et la progression de l'athérosclérose. Ce projet fait suite à la réalisation de travaux préalables montrant que ces peptides d'élastine diminuent l'agrégation plaquettaire ; ce qui suggère un effet anti-thrombotique. Ces résultats sont actuellement en cours de validation in vivo dans un modèle murin de thrombose. Les premiers résultats montrent que les peptides d'élastine retardent la survenue d'une occlusion thrombotique totale au niveau artériel par rapport au souris contrôle. Ainsi, les objectifs visés par ce protocole sont de déterminer si les effets anti-thrombotiques des peptides d'élastine s'accompagnent ou non d'une tendance au saignement. Pour cela, 4 groupes de 5 souris mâles C57Bl/6J (soit 20 souris au total) seront formés et chacun recevra soit du sérum physiologique (groupe contrôle), soit des peptides d'élastine (groupe kE), soit du peptide VGVAPG ou soit du peptide contrôle VVGPGA.

896- La production d'insuline est assurée par les cellules β du pancréas. La destruction de ces cellules suite à l'émergence de réponses lymphocytaires cytotoxiques dirigées contre certaines molécules (préproinsuline, IA2, GAD, ZnT8, chromogranine) exprimées par ces cellules est à l'origine chez l'homme d'un diabète sévère insulino-dépendant ou diabète de type 1. Ces réponses sont liées à la présentation de fragments de ces molécules appelés peptides ou épitopes auto-antigéniques par les molécules HLA de classe I. L'identification de ces épitopes est donc d'intérêt diagnostique (ces réponses précèdent le diabète déclaré cliniquement) et physiopathologique (exacte compréhension des dérèglements immunologiques conduisant au diabète). Cependant l'analyse de ces réponses à partir de prélèvements de patients se heurte à plusieurs difficultés, accès limité aux prélèvements, co-expression de plusieurs molécules HLA différentes par chaque individu, nombre élevé d'épitopes candidats à tester, Pour pallier à ces difficultés et assurer une sélection préclinique des épitopes les plus prometteurs (de manière à concentrer sur ceux-ci les études menées à l'aide de prélèvements humains) des lignées de souris HLA classe I transgéniques et dépourvues de molécules murines de classe I ont été produites depuis 2009 dans le laboratoire. Ces lignées correspondent aux molécules HLA-A1, -A24, -B8, -B27, -B35, -B44 et -C7. Associées aux lignées HLA-A2 et -B7 que nous avons préalablement obtenues, l'ensemble de ces lignées est représentatif d'une large majorité d'individus des différentes populations humaines. Comme ces souris n'expriment à la surface cellulaire qu'une espèce de molécule d'histocompatibilité de classe I, la molécule HLA, elles permettront une identification non ambiguë reproductible dans des laboratoires différents des épitopes auto-antigéniques diabétogènes présentés par ces molécules aux lymphocytes T cytotoxiques.

A ce jour, hormis les épitopes auto-antigéniques présentés par la molécule HLA-A2, fort peu ont été identifiés, même pour des allèles (A24, A1, B8, C7) retrouvés avec une fréquence élevée chez les patients diabétiques. Nous testerons par groupe de 6 souris les peptides potentiellement auto-antigéniques identifiés au sein des auto-antigènes majeurs du diabète de type 1 (préproinsuline, IA2, GAD, ZnT8, chromogranine) à l'aide de programmes prédictifs. Nous avons retenu pour chaque lignée HLA transgénique une moyenne de 30 peptides candidats ce qui correspond à un besoin de 180 souris par lignée. A ces souris immunisées à l'aide de peptides s'ajoutent celles (60 souris par lignée) immunisées à l'aide de vecteurs ADN (pour établir que ces épitopes auto-antigéniques sont bien naturellement apprêtés à partir des molécules auto-antigéniques entières) auxquelles s'ajoutent celles utilisées pour le maintien et le clonage in vitro des lymphocytes auto-réactifs, soit 100 souris supplémentaires par lignée. Au total 3060 souris sont nécessaires pour le développement de ce projet.

Il convient de souligner que ces lignées de souris HLA transgéniques sont également d'intérêt dans le cadre des autres pathologies auto-immunes comme dans celui des pathologies humaines tumorales et infectieuses où elles devraient permettre aux laboratoires qui le souhaiteront aider à la valorisation préclinique de candidats vaccins

897- La borréliose de Lyme est une zoonose transmise à l'Homme de façon accidentelle par piqûre de tiques. Les bactéries responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique. La transmission de cette infection bactérienne se traduit d'abord par une inflammation cutanée au point d'inoculation, puis une dissémination vers les organes cibles : le cœur, l'articulation, le système nerveux, la peau à distance. L'analyse des mécanismes précoces de la transmission constitue notre principal projet de recherche.

60 animaux par an seront utilisés et ce sont des souris C3H/HeN.

898- Chez l'homme, la tolérance opérationnelle correspond à une survie prolongée d'une allogreffe d'organe avec une fonction stable du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur chez un receveur immunocompétent. En 2007, un set de 49 gènes associés à l'état de tolérance opérationnelle permettant de classer les différents groupes de patients selon leur profil clinique a été identifié. Parmi ces 49 gènes, SMILE (TMTC3) est une molécule de fonction inconnue surexprimée dans le sang des patients opérationnellement tolérants. L'objectif de ce projet est de préciser la fonction de la molécule SMILE, notamment en utilisant un modèle de souris inactivée pour le gène smile (TMTC3) : les souris knock-out TMTC3. Au cours de ces deux dernières années, il a été montré que la molécule SMILE était impliquée dans les réponses au stress du réticulum endoplasmique (RE) : L'absence de SMILE sensibilise les cellules à un stress du réticulum endoplasmique. Le stress du RE est impliqué dans de nombreuses réponses cellulaires et a été reconnu dans la

physiopathologie de nombreuses maladies, notamment dans les désordres neurodégénératifs (Parkinson, Alzheimer), le diabète, l'obésité, certains cancers, des désordres immunologiques, l'athérosclérose ou les ischémie-reperfusions cardiaques et cérébrales. La plupart de ces maladies prennent leur origine dans le RE, où toute une machinerie est mise en place pour assurer la synthèse, la modification et la délivrance correcte de protéines biologiquement actives à leur site dans la cellule et dans le milieu extracellulaire. De plus, de nombreuses preuves indiquent que le stress du RE contribue aux dommages glomérulaires et tubulaires chez les patients atteints de maladies aiguës et chroniques des reins. Le stress du RE a été décrit dans plusieurs situations pathologiques rénales et commence à émerger comme un acteur de la perte de structure et de fonction du greffon en transplantation. Le projet consistera d'une part à 1) caractériser le modèle de souris KO TMTC3 maintenant disponible au laboratoire et d'autre part 2) à nous servir de ce modèle pour montrer le rôle de TMTC3 dans la survie du greffon dans un modèle d'allogreffe (greffe de peau) et son rôle dans le stress du réticulum endoplasmique. Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet (souris KO TMTC3, souris contrôles, souris receveuses dans le modèle de greffe de peau) est estimé à 148.

899- La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies (comme les cancers). Cependant, des problèmes majeurs existent. Le rejet aigu, survenant plusieurs jours après la greffe et dû à une reconnaissance des cellules du donneur par les LT CD4+ du receveur, est aujourd'hui contrôlé par des traitements immunosuppresseurs. En revanche, le rejet chronique, survenant jusqu'à plusieurs années après la greffe, n'est à l'heure actuelle pas contrôlé. De plus, les traitements immunosuppresseurs deviennent à long terme toxiques pour les patients. 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.

L'unité INSERM UMR1064 étudie les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe.

Pour cela, nous devons faire appel à des modèles de greffes chez l'animal. Alors que les animaux non traités, dans un modèle CMH incompatible, rejettent leur greffon en 7- 10 jours, il est en effet possible d'éviter le rejet dans ce modèle par l'administration pendant 2 à 4 semaines de différents peptides immunorégulateurs issus des molécules du CMH, ce qui entraîne une survie à long terme des greffons. Des expériences précédentes ont permis de mettre en évidence la reconnaissance de ces peptides par des lymphocytes T régulateurs CD8+CD40RClow, générés dans le modèle de tolérance d'allogreffes cardiaques par injection intracardiaque d'un adénovirus codant pour CD40 Ig. Trois protocoles différents d'administration d'un peptide immunorégulateur identifié seront testés, selon 3 groupes de 10 rats. Un traitement sous-optimal par la rapamycine est envisagé pour aider à l'établissement de cette tolérance si un délai modéré de survie du greffon est constaté. Trois groupes de 10 rats seront donc traités par le peptide immunorégulateur identifié et la rapamycine. La survie du greffon sera comparée à 1 groupe contrôle de 5 rats injectés avec un peptide irrelevant contrôlé selon le même schéma que les groupes test, et un groupe de 5 rats avec peptide irrelevant associé à la rapamycine. Ce modèle animal nous permettra ainsi d'étudier les mécanismes impliqués dans l'induction de tolérance par des peptides immunosuppresseurs, en particulier la génération de LT régulateurs spécifiques. La capacité de tolérance infectieuse des splénocytes des rats présentant une survie à long terme de l'allogreffe sera testée par transfert itératif de splénocytes et les cellules régulatrices mises en jeu seront identifiées par transfert adoptif de populations cellulaires purifiées à 3 nouveaux receveurs chacun. 20 rats receveurs secondaires devraient être suffisants pour l'identification de la population de cellules régulatrices et l'étude de ses mécanismes d'action.

900- La borréliose de Lyme est une zoonose transmise à l'Homme de façon accidentelle par piqûre de tiques. Les bactéries responsables de cette infection sont des spirochètes du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato, transmises à l'hôte au cours du repas sanguin de la tique. La transmission de cette infection bactérienne se traduit d'abord par une inflammation cutanée au point d'inoculation, puis une dissémination vers les organes cibles : le cœur, l'articulation, le système nerveux, la peau à distance. L'analyse des mécanismes précoces de la transmission constitue notre principal projet de recherche.

30 souris/an seront utilisées et des souris C57/BL6

